



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

**Identificación de genes implicados en la eliminación de biotoxinas en el
mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: clonación y expresión de los
cDNA que codifican para tres proteínas transportadoras ABC
pertenecientes a las subfamilias C (proteínas MRP) y G.**

Tesis Doctoral
VANESA LOZANO PAREDES

Santiago de Compostela, 2013



José Luis Sánchez López, profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela.

Antonio Juan Pazos Castelos, profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela.

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Identificación de genes implicados en la eliminación de biotoxinas en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* Lmk.: clonación y expresión de los cDNA que codifican para tres proteínas transportadoras ABC pertenecientes a las subfamilias C (proteínas MRP) y G”, que presenta Vanesa Lozano Paredes para optar al grado de Doctora en Biología, ha sido realizada en este Departamento bajo su dirección y que, considerando que se halla concluida, autorizan su presentación para que sea evaluada por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman el presente informe,

Fdo: José Luis Sánchez López

Fdo: Antonio Juan Pazos Castelos

Fdo: Vanesa Lozano Paredes

Santiago de Compostela, 3 de Abril de 2013.





El trabajo de esta Tesis se ha realizado dentro del Convenio EPITOX, financiado por la Consellería de Innovación e Industria de la Xunta de Galicia: “Episodios tóxicos de origen fitoplanctónico en moluscos bivalvos de Galicia” dentro del Subproyecto 5: “Genes de multirresistencia a xenobióticos (MXR) en moluscos bivalvos: caracterización y determinación de su papel en procesos de desintoxicación de toxinas productoras de DSP”. 2008-2011.

Durante la elaboración de esta Tesis Doctoral, Vanesa Lozano Paredes disfrutó de un contrato laboral como Titulada Superior Bióloga con cargo al convenio en el siguiente período: 16/10/2008 al 15/06/2011.





A mi familia



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a quienes han sido los directores de esta Tesis, al Dr. José Luis Sánchez López y al Dr. Antonio Juan Pazos Castelos, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por su paciencia, su tiempo y el esfuerzo que han dedicado a esta tesis. También a la Dra. María de la Luz Pérez-Parallé Mera por su ayuda y sus palabras de ánimo en la recta final.

Quisiera agradecer al Instituto Tecnolóxico para o Control do Medio Mariño (INTECMAR) por todas las muestras biológicas que me cedieron para poder llevar a cabo mis estudios, en especial a la Dra. Ángeles Morono y a Fabiola Arévalo. Asimismo, gracias al Dr. Juan Blanco y su equipo de Episodios Tóxicos del Centro de Investigacións Mariñas (CIMA) por su ayuda en la realización de los análisis de toxinas.

Muchísimas gracias a Bárbaro por la confianza depositada en mí, su ayuda y sus buenos consejos.

Agradecer a todas las personas que he conocido durante mis años en la universidad. Compañeros de clase y ya buenos amigos (Iria, Raquel, Lorena, Sara, Teresa, Marta y Martín) que a pesar de los años transcurridos y la distancia aún siguen ahí. Por su apoyo, su comprensión, sus ánimos y por los buenos momentos pasados y los que vendrán. A mis compañeros de laboratorio (Óscar, Roi, Vero, Crim y Cristóbal) muchas gracias por vuestra amistad, por las tardes amenas de trabajo y las buenas comidas o cenas compartidas durante estos años. A todos los que estáis o habéis estado en el laboratorio de enfrente (Esther, María, Marcos, Lucía y Chimpì) por la buena compañía, las charlas y el apoyo que siempre he recibido de vosotros. ¡Mucha suerte y ánimo con vuestras Tesis!.

Me gustaría terminar esta tesis dando las gracias a mi familia de la que siempre he recibido su apoyo y cariño. A mis padres, Antonio y Lola, por haberme dado la oportunidad de emprender este viaje y las fuerzas para alcanzar mis sueños. A mis queridísimas hermanas, Marta y Adela, porque siempre os he tenido a mi lado cuidándome y apoyándome en todo momento. Por ser mis amigas y por aguantar las explicaciones sobre mi trabajo. A mis abuelos, Melchor y Maruja, porque siempre habéis creído en mí y por vuestro interés y ganas de ver esta Tesis terminada. Un especial agradecimiento es para Iván, gracias por todo lo que has hecho por mí en estos últimos 13 años. Podría enumerar las miles de cosas por las que te estoy agradecida pero me centraré en las dos más importantes, en tu cariño y apoyo que agradezco con todo mi corazón. Y por último, y quizás a la persona más importante, mi sobrina Noa por todo el cariño, alegría, sonrisas, balbuceos (ahora ya casi palabras), primeros pasos, sorpresas y fotos que me has regalado desde tu llegada.





ABREVIATURAS



A: adenina.

aa: aminoácido.

ABC: *ATP-Binding Cassette*, Casete de Unión a ATP.

ABCP: *Placental ABC protein*.

a.c.: antes de Cristo.

ADP: adenosín difosfato.

Amp: ampicilina.

ANOVA: *Analysis of variance*, Análisis de la varianza.

AO: ácido okadaico.

ASP: *Amnesic shellfish poisoning*, Intoxicación Amnésica por marisco.

ATP: adenosín trifosfato.

Axxx: absorbancia de luz a XXX nm.

AZA: *Azaspiracid poisoning*, Intoxicación Azaspiracida por marisco.

BCRP: *Breast cancer resistance protein*.

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario.

CFP: *Ciguatera fish poisoning*, Intoxicación por ciguatera por pescados.

CFTR: *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística.

cMOAT: *Canalicular multispecific organic anion transporter*, Transportador canalicular multiespecífico de aniones orgánicos.

Cq: *quantification cycle*, ciclo de cuantificación.

CV: coeficiente de variación.

CYP: Citocromo P450.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DNasa: desoxirribonucleasa.

dNTP: desoxirribonucleótido trifosfato.

DSP: *Diarrhetic Shellfish Poisoning*, Intoxicación Diarreica por marisco.

DTT: ditioneitol.

DTX: Dinofisistoxina.

E: eficiencia de la amplificación por PCR.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EMBL-EBI: *European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute*, Laboratorio Europeo de Biología Molecular-Instituto Europeo de Bioinformática.

EST: *Expressed sequence tag*.

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura.

FMO: Monooxigenasas dependientes de flavina.

FPLM: *Four-parameter logistic model*, Modelo logístico de cuatro parámetros.

g: aceleración de la gravedad.

G: guanina.

GSH: glutatión reducido.

GSSG: glutatión oxidado.

GST: Glutatión S-transferasa.

HLA: Antígeno leucocitario humano.

HPLC: *High performance liquid chromatography*, Cromatografía líquida de alta resolución.

HUGO: *Human Genome Nomenclature Committee.*

INTECMAR: Instituto Tecnológico para o Control do Medio Mariño.

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

kb: kilobase.

kDa: kiloDalton.

L: litro.

LB: medio de cultivo bacteriano Luria-Bertani.

LOD: *limit of detection*, límite de detección.

LXR: Receptor hepático X.

m: metros.

M: molar.

MAA: músculo aductor anterior.

MAO: Monoaminooxidasas.

MAP: músculo aductor posterior.

MARB: músculo anterior retractor del biso.

MDR: *Multidrug Resistance*, Resistencia múltiple frente a fármacos o Multirresistencia frente a fármacos.

mg: miligramo.

min: minuto.

mL: mililitro.

mM: milimolar.

MPRB: músculo posterior retractor del biso.

mRNA: ácido ribonucleico mensajero.

MRP: *Multidrug Resistance-associate Protein*, Proteína asociada a la multirresistencia frente a fármacos.

MS/MS: *Mass spectrometry/mass spectrometry*, Espectrometría de masas/masas.

MXR: *Multixenobiotic Resistance*, Resistencia múltiple frente a xenobióticos o Multirresistencia frente a xenobióticos.

MXR: *Mitoxantrone resistance protein*.

N: normalidad.

NBD: *Nucleotide Binding Domain*, Dominio de Unión a Nucleótido.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*, Centro Nacional de Información Biotecnológica.

ng: nanogramo.

nm: nanómetros.

NSP: *Neurotoxic Shellfish Poisoning*, Intoxicación Neurológica por marisco.

núm.: número.

OD: densidad óptica.

ORF: *Open Reading Frame*, Marco de lectura abierto.

p: valor p de significación.

pb: pares de bases.

PBP: Proteína de unión periplasmática.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa.

PDZ: Dominios modulares de interacción entre proteínas.

PFIC2: Colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 2.

PFIC3: Colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 3.

P-gp: P-glucoproteína.

Pi: fosfato inorgánico.

PP1: proteína fosfatasa 1.

PP2A: proteína fosfatasa 2A.

PSP: *Paralytic Shellfish Poisoning*, Intoxicación Paralizante por marisco.

PTX: Pectenotoxinas.

p:v: peso:volumen.

r: coeficiente de correlación.

RACE: *Rapid Amplification of cDNA Ends*, Amplificación de los extremos del cDNA.

ref.: referencia.

RQ: *relative quantities*, cantidad relativa.

RNA: ácido ribonucleico.

RNasa: ribonucleasa.

rRNA: ácido ribonucleico ribosomal.

RT: *Reverse Transcription*, Transcripción inversa.

RT-PCR: *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*, Transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa.

RT-qPCR: Transcripción inversa seguida de PCR en tiempo real cuantitativa.

s: segundos.

SD: desviación estándar.

SDM: máximo de la segunda derivada.

SPE: *Solid phase extraction*.

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*, Programa estadístico en las ciencias sociales.

SUR: Receptor sulfonilurea.

Tm: temperatura de fusión.

TM: segmento transmembrana.

TMD: Dominio transmembrana.

TBE: tampón Tris-ácido bórico-EDTA.

UV: ultravioleta.

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

YTX: Yesotoxinas.

μ g: microgramo.

μ L: microlitro.

μ m: micrómetro.

μ M: micromolar.

Δ^{Cq} : diferencial del ciclo de cuantificación.

°C: grados Celsius.





ÍNDICE



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Los moluscos bivalvos	3
1.1.1. Importancia económica.....	3
1.1.2. El mejillón <i>Mytilus galloprovincialis</i> . Descripción anatómica y fisiológica.....	4
1.2. Episodios tóxicos	12
1.2.1. Toxinas responsables de las intoxicaciones paralizantes (PSP, <i>Paralytic Shellfish Poisoning</i>)...	12
1.2.2. Toxinas responsables de las intoxicaciones amnésicas (ASP, <i>Amnesic Shellfish Poisoning</i>).....	13
1.2.3. Toxinas lipofílicas responsables de las intoxicaciones diarreicas.....	14
1.2.3.1. Toxinas del grupo del ácido okadaico (DSP, <i>Diarrhetic Shellfish Poisoning</i>).....	14
1.2.3.2. Azaspirácidos (AZA).....	16
1.2.4. Toxinas lipofílicas no diarreogénicas.....	16
1.2.4.1. Pectenotoxinas (PTX).....	17
1.2.4.2. Yessotoxinas (YTX).....	17
1.2.5. Toxinas neurotóxicas (NSP, <i>Neurotoxic Shellfish Poisoning</i>).....	17
1.2.6. Ciguatera (CFP, <i>Ciguatera Fish Poisoning</i>).....	17
1.2.7. Palitoxina.....	17
1.3. Transportadores ABC (ATP-Binding Cassette)	19
1.3.1. Organización estructural de los transportadores ABC.....	20
1.3.2. Mecanismo de transporte.....	22
1.3.3. Clasificación de la familia ABC.....	25
1.3.4. Multirresistencia frente a xenobióticos (MXR) en organismos acuáticos.....	28
2. OBJETIVOS	29
3. CAPÍTULO I: Clonación de los cDNA que codifican para proteínas de la subfamilia ABCC en <i>Mytilus galloprovincialis</i>	33
3.1. Introducción	35
3.2. Materiales y métodos	41
3.2.1. Obtención de los animales.....	41
3.2.2. Extracción de RNA y transcripción inversa.....	41
3.2.3. Amplificación del fragmento inicial de los genes <i>mrp</i> mediante PCR.....	43
3.2.4. Amplificación de los extremos 5' y 3' de cada cDNA.....	44
3.2.5. Ligación, clonación y secuenciación.....	46
3.2.6. Análisis de las secuencias.....	49
3.3. Resultados	50
3.3.1. Clonación de los cDNA que codifican para proteínas de la subfamilia ABCC y caracterización de dichas proteínas.....	50
3.3.2. Análisis filogenético.....	67
3.4. Discusión	69

4. CAPÍTULO II: Clonación del cDNA que codifica para una proteína de la subfamilia ABCG en <i>Mytilus galloprovincialis</i>.....	73
4.1. Introducción.....	75
4.2. Materiales y métodos.....	81
4.2.1. Obtención de los animales.....	81
4.2.2. Extracción de RNA y transcripción inversa.....	81
4.2.3. Amplificación del fragmento inicial y de los extremos 5' y 3' de cDNA del gen <i>abcg2</i>	82
4.2.4. Ligación, clonación y secuenciación.....	83
4.2.5. Análisis de las secuencias.....	84
4.3. Resultados.....	84
4.3.1. Clonación del cDNA que codifica para una proteína de la subfamilia ABCG y caracterización de dicha proteína.....	84
4.3.2. Análisis filogenético.....	90
4.4. Discusión.....	92
5. CAPÍTULO III: Expresión de los genes <i>mrp1</i>, <i>mrp2</i> y <i>abcg2</i> en <i>Mytilus galloprovincialis</i>.....	97
5.1. Introducción.....	99
5.2. Materiales y métodos.....	103
5.2.1. Obtención de los animales.....	103
5.2.2. Extracción de toxinas y análisis de ácido okadaico.....	105
5.2.3. Extracción de RNA y transcripción inversa.....	105
5.2.4. Diseño de cebadores.....	106
5.2.5. PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR).....	108
5.2.6. Determinación de la eficiencia de la amplificación en cada gen.....	110
5.2.7. Selección de los genes de referencia.....	111
5.2.8. Cálculo de la expresión normalizada.....	112
5.2.9. Análisis estadístico.....	112
5.3. Resultados.....	113
5.3.1. Análisis de la concentración de ácido okadaico en glándula digestiva.....	113
5.3.2. Confirmación de la especificidad de los cebadores.....	115
5.3.3. Análisis de estabilidad de los genes de referencia.....	115
5.3.3.1. En los tres tejidos conjuntamente.....	116
5.3.3.2. En cada tejido individualmente.....	119
5.3.3.2.1. Glándula digestiva.....	119
5.3.3.2.2. Branquia.....	122
5.3.3.2.3. Manto.....	124
5.3.4. Estudio de la expresión de los genes <i>mrp1</i> , <i>mrp2</i> y <i>abcg2</i> en tejidos de <i>Mytilus galloprovincialis</i>	126

5.3.5. Estudio de la expresión de los genes <i>mrp1</i> , <i>mrp2</i> y <i>abcg2</i> en <i>Mytilus galloprovincialis</i> durante un episodio tóxico.....	130
5.3.5.1. Glándula digestiva.....	130
5.3.5.2. Branquia.....	138
5.3.5.3. Manto.....	144
5.4. Discusión.....	148
6. CONCLUSIONES.....	159
7. BIBLIOGRAFÍA.....	163
8. ANEXOS.....	199





RESUMEN

Los mejillones del género *Mytilus* viven en hábitats fluctuantes en los que su capacidad para adaptarse a los cambios del entorno es esencial para su supervivencia. Como organismos filtradores se alimentan sobre todo de fitoplancton y también de la materia orgánica en suspensión. En ocasiones el fitoplancton contiene especies tóxicas para el hombre o que producen efectos nocivos en los bivalvos. Una vez que las toxinas son ingeridas por los bivalvos pueden acumularse, transformarse y eliminarse. La biotransformación y eliminación de las toxinas o xenobióticos tiene lugar en varias fases en alguna de las cuales participan proteínas transportadoras ABC.

Los transportadores pertenecientes a la superfamilia ABC (*ATP-Binding Cassette*) de proteínas, se encuentran en todos los organismos desde bacterias hasta humanos. Los miembros de esta familia están implicados en el transporte activo de numerosos compuestos estructuralmente diversos a través de la membrana celular. Entre ellos destacan los transportadores implicados en la resistencia múltiple frente a fármacos (MDR). En organismos acuáticos, expuestos a toxinas o contaminantes antropogénicos existe un fenómeno análogo llamado resistencia múltiple frente a xenobióticos (MXR).

El objetivo de esta Tesis es demostrar la presencia de genes que codifican para proteínas ABC pertenecientes a las subfamilias ABCC y ABCG, y determinar su papel en los procesos de desintoxicación del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) frente a toxinas causantes de DSP (intoxicación diarreica por mariscos).

Empleando diversas técnicas de biología molecular (PCR, RACE, clonación y secuenciación) obtuvimos las secuencias completas de los cDNA que codifican para dos proteínas transportadoras ABCC (MRP1 y MRP2) y una proteína ABCG (ABCG2). Asimismo, para llevar a cabo los estudios de expresión de estos genes, identificamos genes de referencia adecuados para normalizar los datos de expresión empleando los programas *geNorm*, *NormFinder* y *BestKeeper*. Mediante RT-qPCR analizamos la expresión de estos genes en diferentes tejidos y durante un proceso de intoxicación por toxinas DSP.

Cuando comparamos los tres tejidos estudiados observamos que la expresión de los genes *mrp1* y *mrp2* es significativamente mayor en glándula digestiva y branquia que en manto sugiriendo el papel de estos tejidos en los procesos de desintoxicación, mientras que *abcg2* tiene una expresión significativamente mayor en el manto que en los otros dos tejidos. En presencia de toxinas DSP, encontramos variaciones significativas en los niveles de expresión del gen *mrp2* en glándula digestiva. El ácido okadaico induce significativamente la expresión del gen *mrp2*, dicha expresión llega a

ser hasta 7,8 veces superior en presencia de la toxina que en el control. Por su parte, en branquia y manto no observamos inducción de la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2*. Ello sugiere la implicación de la glándula digestiva en el metabolismo de los xenobióticos, mientras que la branquia y manto tienen una menor participación en la eliminación de metabolitos conjugados.



ABSTRACT

Mussels of the genus *Mytilus* live in fluctuating habitats where their ability to adapt to environmental changes is essential for their survival. As filtering organisms they feed mainly on phytoplankton and also on organic matter in suspension. Sometimes phytoplankton contains toxic species that produce adverse effects in bivalves or are toxic to humans. Once the toxins are ingested by bivalves, they can be accumulated, be transformed and be removed. The biotransformation and elimination of the toxins or xenobiotics takes place in several steps in which some of the ABC transporter proteins are involved.

The transporters belonging to the ABC proteins superfamily (ATP-Binding Cassette) are found in every organism from bacteria to humans. Members of this family are involved in active transport of structurally diverse compounds through the cell membrane. Between which stand out the transporters involved in the multidrug resistance (MDR). In aquatic organisms exposed to toxins or anthropogenic pollutants there is a similar phenomenon called multixenobiotic resistance (MXR).

The aim of this Thesis is to demonstrate the presence of genes encoding ABC proteins belonging to the ABCC and ABCG subfamilies, and to determine their role in detoxification processes against toxins causing DSP (*Diarrhetic Shellfish Poisoning*) on mussels (*Mytilus galloprovincialis*).

Using molecular biology techniques (like PCR, RACE, cloning and sequencing) we have obtained full-length cDNAs encoding two ABCC proteins (MRP1 and MRP2) and one ABCG protein (ABCG2). To carry out the expression studies of these genes, we have also identified the most suitable reference genes to normalize expression data using the *geNorm*, *NormFinder* and *BestKeeper* programs. Changes in the expression of these genes in different tissues and along an intoxication process by DSP toxins were assessed through RT-qPCR.

We found that the expression of *mrp1* and *mrp2* genes is significantly higher in digestive gland and gill than in mantle suggesting the role of these tissues in the detoxification, whereas *abcg2* has a significantly higher expression in the mantle than in the other two tissues. In the presence of DSP toxins, we have found significant changes in the *mrp2* gene expression levels in digestive gland. Okadaic acid induces a significant increase in the expression of the *mrp2* gene, which becomes up to 7.8-fold higher in the presence of toxin than in the control. However, in gill and mantle the expression of *mrp1*, *mrp2* and *abcg2* was not induced by okadaic acid. These results suggest the digestive gland involvement in the metabolism of xenobiotics, while gill and mantle have lower participation in the elimination of conjugated metabolites.





1. INTRODUCCIÓN GENERAL



1.1.- LOS MOLUSCOS BIVALVOS.

1.1.1.- Importancia económica.

Los moluscos son un filo muy diversificado y presentan, tras el filo artrópodos, el mayor número de especies conocidas dentro del reino animal. Son invertebrados protóstomos celomados y no segmentados de cuerpo blando, desnudo o protegido por una concha. Los más importantes desde el punto de vista de la acuicultura son los moluscos bivalvos.

El aumento de la población humana y el estado de sobreexplotación de los recursos pesqueros hace que la acuicultura se desarrolle cada vez más y cobre mayor importancia (Blanco-Pérez, 2001). Es por tanto, el sector de producción de alimentos de origen animal que más crece en el mundo.

La acuicultura, entendida según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), es la actividad dirigida a producir y engordar organismos acuáticos. En los últimos años su actividad ha crecido hasta equipararse a la producción de la pesca de captura. Atendiendo a la producción en términos de grupos de especies cultivadas, los peces de agua dulce son dominantes seguidos por los moluscos, los crustáceos y los peces diádromos (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO, 2012) (Figura 1).

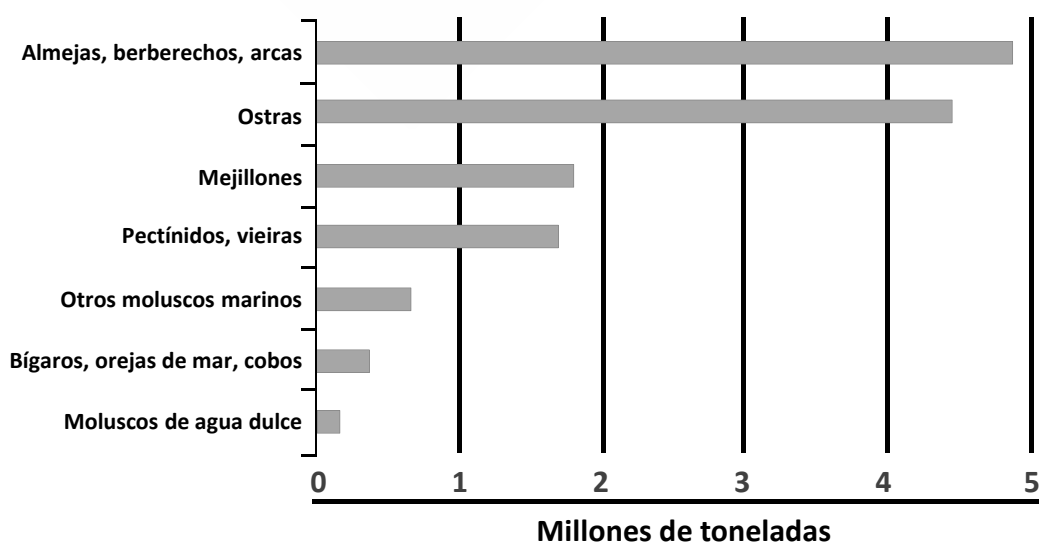


Figura 1. Producción de las principales especies de moluscos procedente de la acuicultura en 2010 (FAO, 2012).

Galicia siempre ha utilizado los recursos proporcionados por el mar, siendo una de las mayores potencias mundiales en la producción de productos de acuicultura y en el cultivo de moluscos bivalvos (Camacho y Cuña Casasbellas, 1992). La característica más importante de Galicia desde el punto de vista de la acuicultura, es la existencia de las rías que constituyen un ecosistema perfecto para el desarrollo de los cultivos acuícolas. Otro factor que influye en el desarrollo de la acuicultura gallega es la gran riqueza de las aguas debida tanto al aporte de materiales de los ríos como la entrada de agua oceánica, rica en nutrientes, por el fondo de la ría que se mezcla con el agua superficial que sale (Albentosa Verdú, 1992).

El aprovechamiento en Galicia de los moluscos se remonta al siglo IV a.c. por la presencia de grandes depósitos de conchas de almejas, ostras y mejillones denominadas “concheiros” que evidencian el consumo de estos recursos (Vázquez, 1975). La tradición del cultivo de mejillón en las rías gallegas se inició en los años cuarenta y su desarrollo tuvo lugar desde mediados de los sesenta a mediados de los setenta.

La especie de mejillón que se cultiva en Galicia pertenece al género *Mytilus*. Tradicionalmente se clasificó como *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), sin embargo, los estudios realizados en los últimos años sobre sus características morfológicas y genéticas lo identifican como *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) (Sanjuan *et al.*, 1990, 1994). El cultivo de mejillones o miticultura se basa en los mismos principios que la ostricultura. Se cultivan fijados sobre cuerdas que penden de unas plataformas flotantes, denominadas bateas y consta de cinco etapas que incluyen: la obtención de la semilla, la colocación de los juveniles en las cuerdas o encordado, el preengorde, el desdoble y la cosecha.

1.1.2.- El mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Descripción anatómica y fisiológica.

Los mejillones son organismos de carácter sedentario y gregario, que se fijan en sustratos resistentes formando grandes colonias. Viven en aguas litorales y sublitorales poco profundas y preferentemente en zonas de corrientes.

Características anatómicas del mejillón (información tomada del libro Brusca y Brusca, 2005).

La concha. Los mejillones tienen el cuerpo comprimido lateralmente y encerrado en una concha rígida formada por dos valvas. Las valvas son alargadas, simétricas y de forma triangular. Su superficie externa es de un color negro-azulado y

está recorrida por unas finas estrías concéntricas, que se corresponden con las diferentes etapas de crecimiento del mejillón. La parte anterior es puntiaguda mientras que la posterior es redondeada. El margen dorsal de cada valva es convexo y el ventral es más cóncavo. Las valvas se mantienen unidas mediante una bisagra o ligamento y se articulan por medio de unos pequeños dientes que forman la charnela (Figura 2).

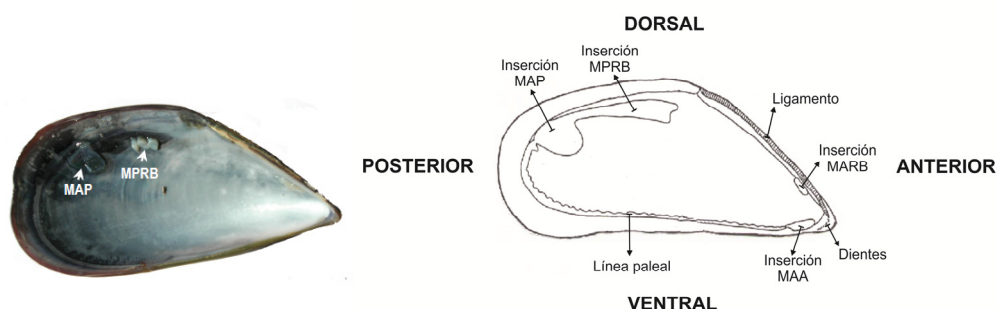


Figura 2. Morfología de la concha de *Mytilus galloprovincialis*. MAA: músculo aductor anterior; MAP: músculo aductor posterior; MARB: músculo anterior retractor del biso; MPRB: músculo posterior retractor del biso (Modificado de Bardales, 2007).

Las valvas están recubiertas en su superficie externa por una fina película de color marrón y naturaleza proteica denominado periostraco. Por debajo de ella se sitúa una capa calcárea nacarada, secretada por las células del manto, que está en contacto con el cuerpo del mejillón.

El manto. El cuerpo del mejillón se encuentra envuelto por el manto, formado por dos lóbulos unidos en la cara anterior y dorsal. En la zona posterior los lóbulos forman un orificio para la salida del agua: el sifón exhalante, y quedan libres en la zona ventral, permitiendo la entrada de agua a las branquias y la salida del pie y del biso (Figura 3). Entre los lóbulos aparece un espacio interno, la cavidad paleal, en la que se alojan las branquias, el pie y la masa visceral. El tejido está adherido y fijado a la concha a través de fibras musculares o músculo paleal. La línea de anclaje de este músculo a la concha discurre paralela y próxima al borde de las valvas y se denomina línea paleal (Figura 2).

El papel fundamental del manto es la formación de la concha y la secreción del ligamento. Puede considerarse como un tejido de reserva energética, que acumula tanto glucógeno como triglicéridos, pero en el mejillón adulto, interviene en la reproducción al ubicarse en él la mayor parte del tejido gonadal.

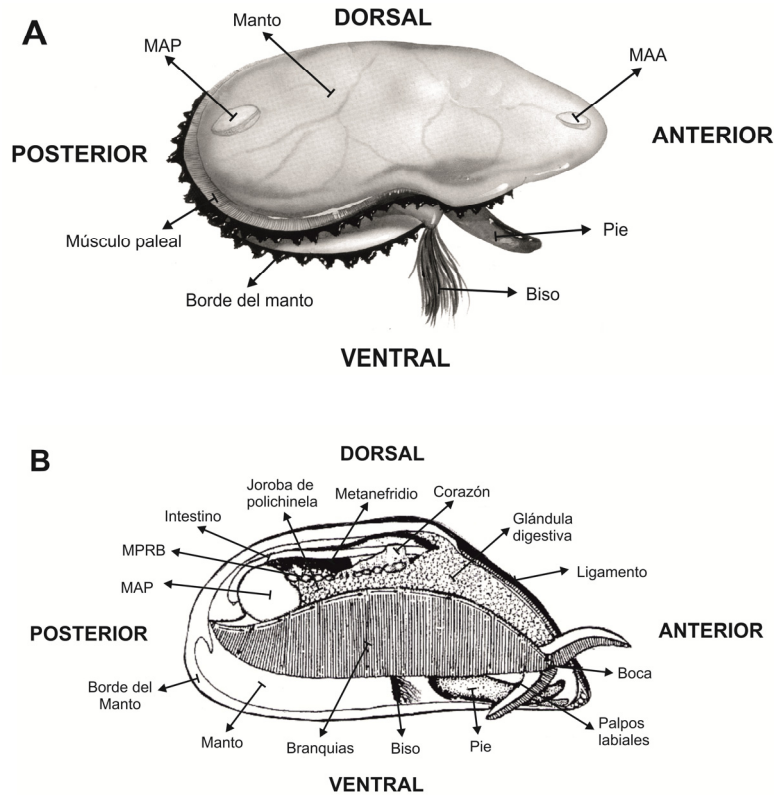


Figura 3. Anatomía de *Mytilus*. (A) Morfología general del cuerpo del mejillón. (B) Corte longitudinal. MAA: músculo aductor anterior; MAP: músculo aductor posterior (Modificado de Bardales, 2007).

La gónada. Los mejillones presentan sexos separados (Skibinski *et al.*, 1994; Zouros *et al.*, 1994) aunque se conocen casos de hermafroditismo (Beaumont y Matin-Abdul, 1994). No presentan dimorfismo sexual, externamente los dos sexos son iguales, y su fecundación es externa.

Las gónadas están alojadas en el interior de la joroba, o glándula de polichinela, localizada en la parte posterior del pie. En estos moluscos, la gónada no es un órgano diferenciado sino que se desarrolla invadiendo el tejido del manto durante el ciclo reproductor, por tanto, su volumen y aspecto externo varía a lo largo de la gametogénesis. La gametogénesis, por lo general, ocurre en invierno y la puesta es en primavera aunque la duración del período de la actividad gonadal está relacionada con las condiciones ambientales, como la temperatura o la disponibilidad de alimento.

Los músculos. Las valvas de la concha se mantienen cerradas por acción de dos músculos, cuyos extremos se hallan adheridos a cada una de las valvas, denominados músculos aductores anterior y posterior. Uno de ellos, de mayor tamaño, se localiza en

la parte posterior de la región dorsal y se denomina músculo aductor posterior (MAP), mientras que el otro, más pequeño, se sitúa en la posición anterior del borde ventral, el músculo aductor anterior (MAA) (Figura 2).

Los músculos del pie y los retractores del pie y del biso, se encargan, respectivamente, de estirar y encoger el pie dentro de la concha, permitiendo así los movimientos del mejillón. Los músculos paleales del mejillón unen la concha con el borde del manto estando especialmente desarrollados en la parte ventral posterior.

Las branquias. Las branquias o “ctenidia” son unas estructuras laminares situadas en la cámara paleal entre el manto y la masa visceral (Morton, 1992).

Cada una de las dos branquias está formada por dos láminas que dividen la cavidad paleal en dos partes: una externa próxima al manto, la cámara inhalante, y otra interna, la cámara exhalante. A su vez, cada lámina branquial está formada por dos lamelas: la lamela descendente, interior, que se dirige hacia la parte ventral, y que continúa con la lamela ascendente, exterior, que se dirige de nuevo hacia la parte dorsal (Figura 4). De manera que, cada una de las branquias en corte transversal muestra una forma de “W”. Las líneas interiores de la “W” corresponden a las lamelas descendentes, que se hallan unidas a la masa visceral a través del eje branquial, donde se sitúan los vasos aferente y eferente y también los principales músculos responsables del movimiento branquial. Las dos líneas exteriores de la “W” se corresponden con las lamelas ascendentes, cuyos extremos superiores no están unidos a la masa visceral. Hacia la parte dorsal, ambas lamelas, descendente y ascendente, se encuentran separadas entre sí por una estrecha cavidad interlamelar, mientras que, en la parte ventral forman un septo interlamelar en el que ambas se hallan unidas a través de numerosos puentes interfilamentosos. Cada lamela está formada por series de filamentos dispuestos en paralelo y unidos unos a otros a través de uniones interfilamentosas compuestas por tejido conjuntivo y fibras musculares. Estos filamentos constituyen las unidades funcionales básicas de las branquias.

Las branquias desempeñan una doble función respiratoria y alimenticia (Morton, 1983). Por una parte son responsables de la hematosis, intercambio de sustancias gaseosas entre la hemolinfa y el medio acuoso, y por otra parte están implicadas en la captación de partículas alimenticias del medio y en la absorción de nutrientes y sustancias orgánicas disueltas. Estas funciones las realizan las células ciliadas y mucosas que atraen, seleccionan, capturan y conducen las partículas alimenticias del fitoplancton hacia los palpos labiales y la boca (Jørgensen, 1989; Iglesias *et al.*, 1993). A través del movimiento ciliar el agua del medio, rica en oxígeno y alimento, penetra

por la abertura inhalante, situada en posición ventral, pasa a través de las laminillas branquiales donde es captado el oxígeno y el alimento, y sale al exterior por la abertura o sifón exhalante, situado en la posición antero-dorsal.

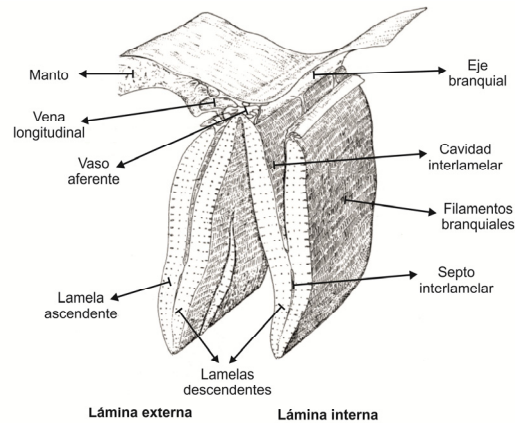


Figura 4. Estructura de las láminas branquiales en corte transversal de los moluscos (Modificado de Bardales, 2007).

Los palpos labiales. Los palpos labiales son unas estructuras delgadas y alargadas, con forma triangular, que rodean la boca (Figura 5). Su función es seleccionar y conducir la entrada de alimento, captado por las branquias, al aparato digestivo (Morton, 1992). Las partículas recogidas por las branquias y no aptas para ser ingeridas son envueltas en mucus y expulsadas al exterior, constituyendo las pseudoheces.

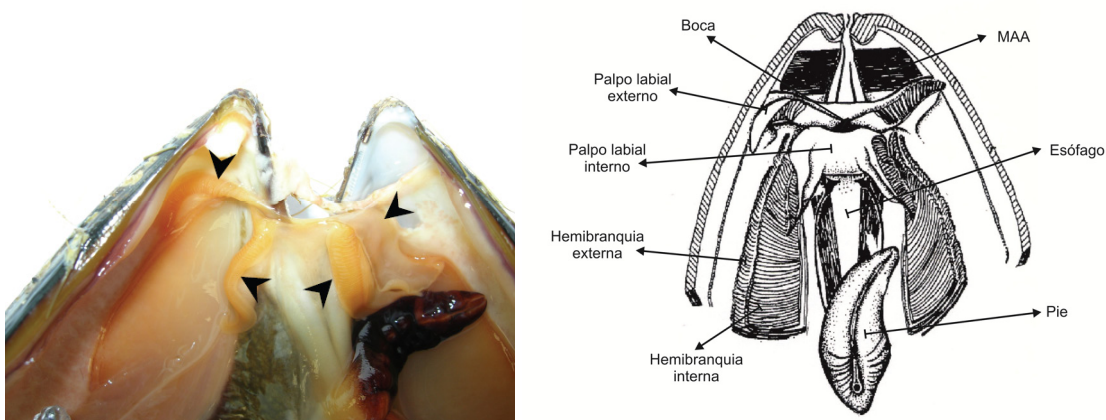


Figura 5. Localización de los palpos labiales en *Mytilus galloprovincialis*. MAA: músculo aductor anterior (Modificado de Bardales, 2007).

El aparato digestivo. El aparato digestivo del mejillón consta de boca, esófago, estómago e intestino. Rodeando el estómago y parte del intestino se localiza la glándula digestiva o hepatopáncreas (Figura 6) (Morton, 1983; Purchon, 1987).

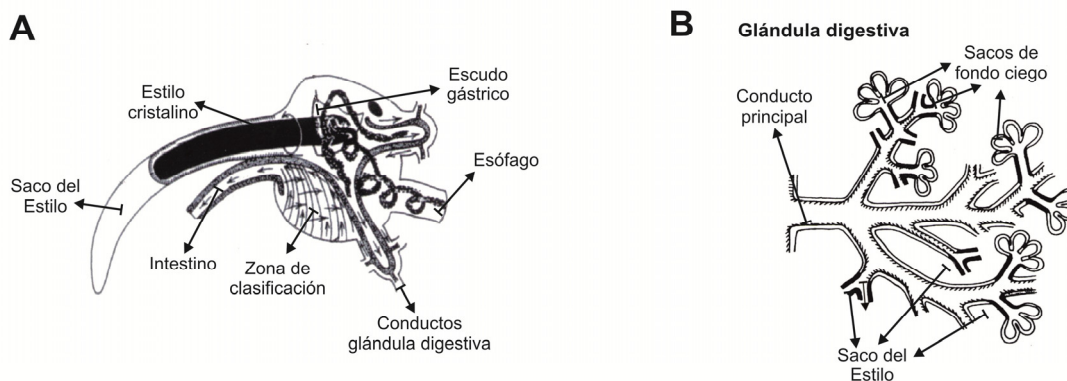


Figura 6. Estructura del aparato digestivo (A) y detalle de la glándula digestiva (B) en *Mytilus galloprovincialis* (Modificado de Bardales, 2007).

El aparato digestivo comienza en la boca, localizada entre los palpos labiales, a lo que sigue un pequeño y estrecho esófago que se abre a la cara interna del estómago, donde también desembocan los conductos de la glándula digestiva. En la pared anterior del estómago se encuentra una placa de quitina, denominada escudo gástrico, y una protuberancia llamada saco del estilo. El saco del estilo secreta una sustancia gelatinosa que forma un bastoncillo, el estilo cristalino. El estilo cristalino rota en el interior del saco por acción de los cilios de la pared, choca contra el escudo gástrico y libera al estómago enzimas digestivas. El contenido estomacal, con partículas parcialmente digeridas, es dirigido a la región separadora. En esta región, las partículas pequeñas y pesadas o las partículas grandes, pasan directamente al intestino para ser eliminadas como heces, mientras que las partículas pequeñas y ligeras se dirigen hacia la glándula digestiva donde continuarán el proceso de digestión.

La glándula digestiva se compone de numerosos túbulos digestivos de fondo ciego, globular o alargado, con un espacio interior o lumen, que desembocan en un conducto secundario, no ciliado que desembocan a su vez en uno primario y finalmente en el estómago.

Los túbulos digestivos están formados principalmente por dos tipos de células: las digestivas o acidófilas y las secretoras o basófilas (Morton, 1983; Weinstein, 1995). Las primeras poseen un núcleo cerca de la cara basal y un citoplasma lleno de vacuolas digestivas, entre sus funciones está la digestión intracelular, desintoxicación,

biotransformación de los xenobióticos y defensa antioxidante (Gosling, 2003). Las células secretoras, por su parte, presentan un citoplasma con abundante retículo endoplasmático rugoso y cuerpos de Golgi. Su principal función es formar células digestivas aunque también parecen tener función secretora (Henry *et al.*, 1991).

El pie y el biso. El pie es un órgano musculoso con forma de lengüeta localizado en el medio de la masa visceral, en la parte ventral. A diferencia de otros moluscos bivalvos, en los que el pie es utilizado para excavar, en el mejillón se utiliza para fabricar una estructura formada por hebras que permite al molusco adherirse de forma permanente a un sustrato, y que se conoce con el nombre de biso (Figura 3).

El pie y el biso se mueven con respecto al cuerpo por acción de una serie de músculos extrínsecos, con forma de cuerda y en número par, que se unen por uno de sus extremos a la concha y por el otro se insertan en la base del pie o a nivel de la glándula del biso. Se denominan músculos retractores del biso, anteriores y posteriores (MARB, MPRB), y músculo posterior retractor del pie. Son responsables de la retracción del pie y de que el molusco pueda modular la tensión del biso y ajustar su proximidad a un sustrato.

El sistema circulatorio. El aparato circulatorio del mejillón, cuya función es distribuir el oxígeno y el alimento, y recoger el anhídrido carbónico y los productos de desecho, está formado por el corazón, el sistema arterial y el sistema venoso. Se trata de un sistema vascular abierto en el que la hemolinfa y las células sanguíneas o hemocitos dejan eventualmente los vasos para invadir las lagunas o senos tisulares (Hill y Welsh, 1966; Narain, 1976).

El corazón del mejillón, situado en la zona dorsal y rodeada por una membrana transparente (el pericardio), está formado por un ventrículo y dos aurículas. Del corazón salen dos arterias, una anterior y otra posterior, que se ramifican por todo el cuerpo terminando en una serie de senos lagunares de los que parten las venas que llevan la hemolinfa a las branquias, donde se oxigena, y posteriormente vuelve al corazón.

El sistema excretor. Está formado las glándulas pericárdicas y dos riñones o metanefridios que drenan la cavidad pericárdica, que es la que recibe el ultrafiltrado de la hemolinfa originado por las aurículas (Pirie y George, 1979).

El proceso de excreción en el mejillón tiene lugar a través del complejo corazón-riñón. Las sustancias de desecho que lleva la hemolinfa son eliminadas en parte por las

glándulas pericárdicas vertiendo directamente a la cavidad pericárdica. De aquí pasan a los metanefridios donde tiene lugar la reabsorción de glucosa y agua, y a continuación son expulsadas al exterior (Andrews, 1988, Andrews y Jennings, 1993).

El sistema nervioso-sensorial. El sistema nervioso presenta simetría bilateral y está formado por tres pares de ganglios (cerebrales, viscerales y pedales), y dos largos cordones nerviosos denominados conectivos cerebroviscerales y cerebropedales (Makman y Stefano, 1984; Stefano *et al.*, 1990).

Los ganglios cerebrales están situados a los lados del esófago, de ellos salen nervios al músculo aductor anterior, la porción anterior del manto, los palpos labiales, el esófago y los estatocitos (Tauc, 1966). Los viscerales se sitúan debajo del músculo aductor posterior e inervan el manto, los sifones, el músculo aductor posterior, el músculo posterior retractor del pie, las branquias, los riñones, el corazón, la gónada y el intestino. Los ganglios pedales, situados en la base del pie, inervan el pie y el músculo retractor del biso.

Además de los ganglios nerviosos, aparecen también distintos órganos de los sentidos, entre los que destacan los tentáculos del manto, que permiten al mejillón detectar las variaciones en la composición del agua, y los estatocitos que son los responsables del equilibrio.

1.2.- EPISODIOS TÓXICOS.

Los mejillones como la mayoría de moluscos bivalvos se alimentan filtrando las partículas suspendidas en el agua, cuyo principal constituyente es el fitoplancton. Las interrelaciones entre ambos en la mayoría de los casos son positivas para los bivalvos, ya que el fitoplancton le sirve de alimento, sin embargo, en ocasiones el contacto o la ingesta de fitoplancton puede producir diversos efectos nocivos (Blanco-Pérez, 2001). El término episodio tóxico se emplea para referirse a una proliferación de microalgas que producen toxinas que se acumulan en los organismos que las consumen y resultan dañinas para el hombre por sus efectos adversos en la salud humana, en las explotaciones de acuicultura y en las poblaciones naturales de organismos marinos. En los últimos años la aparición de este tipo de episodios ha aumentado en frecuencia, intensidad y distribución geográfica.

La abundancia de las microalgas está influenciada por factores primarios o limitantes, como cambios en la iluminación y la disponibilidad de nutrientes, y factores secundarios o reguladores, como cambios en la salinidad o la temperatura y depredación por el zooplancton herbívoro. Esta variación en la abundancia afecta a varias especies de microalgas a la vez, sin embargo, en determinados casos se produce la proliferación masiva de una especie en particular a expensas de las restantes. Aproximadamente de las casi 4.000 especies marinas del fitoplancton microscópico que existen son tóxicas alrededor de 60 de ellas (Hallegraeff, 1995).

Las toxinas responsables de los episodios tóxicos, atendiendo a los efectos biológicos que producen, se pueden clasificar en siete grupos principales que se describen a continuación (Escudeiro Rossignoli, 2012).

1.2.1.- Toxinas responsables de las intoxicaciones paralizantes (PSP, *Paralytic Shellfish Poisoning*).

El principal representante de este grupo de toxinas es una guanidina heterocíclica llamada saxitoxina (Figura 7) que fue la primera toxina de este grupo descrita (Schantz *et al.*, 1961). El mecanismo de acción de este tipo de toxina es bloquear los canales de sodio, de manera que disminuyen o impiden la propagación de los impulsos nerviosos. Los principales responsables de la producción de estas toxinas son varios dinoflagelados del género *Alexandrium* (Doucette y Anderson, 1993), *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* (Anderson *et al.*, 1989), *Gymnodinium*

catenatum (Bates *et al.*, 1978) y cianofíceas como *Aphanizomenon flosaquae* (Mahmood y Carmichael, 1986).

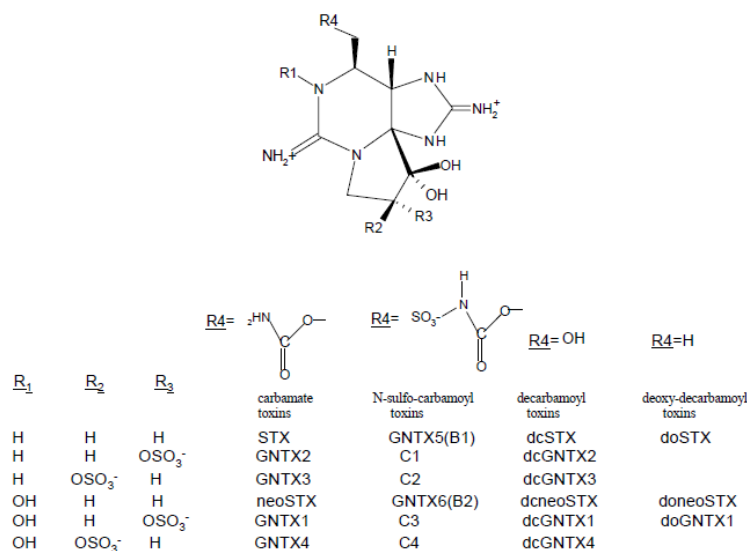


Figura 7. Estructura química de las toxinas PSP (Mons *et al.*, 1998; Quilliam, 2001).

1.2.2.- Toxinas responsables de las intoxicaciones amnésicas (ASP, *Amnesic Shellfish Poisoning*).

La principal toxina responsable de este tipo de intoxicación es el ácido domoico (Figura 8), un aminoácido análogo del neurotransmisor glutamato y potente antagonista de su receptor. Su acción produce un aumento substancial de Ca⁺⁺ intracelular que lleva a la muerte celular en las áreas del cerebro donde los receptores del glutamato son especialmente importantes, como la zona del hipocampo implicada en el aprendizaje y el procesamiento de la memoria y la zona que controla la función visceral (Peng *et al.*, 1994). Actualmente se conocen varias especies de diatomeas del género *Pseudonitzschia*, como *P. multiseries*, *P. australis* y *P. pseudodelicatissima* que producen estas sustancias (Subba Rao *et al.*, 1988; Bates *et al.*, 1989).

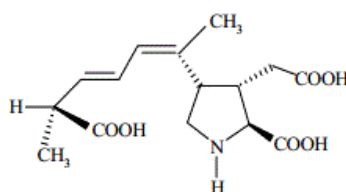


Figura 8. Estructura química del ácido domoico (FAO, 2007).

1.2.3.- Toxinas lipofílicas responsables de las intoxicaciones diarreicas.

Sus repercusiones sobre la salud humana son menos drásticas, pero debido a su amplia distribución geográfica y su elevada frecuencia de aparición, constituye uno de los grupos más importantes. Los responsables de esta intoxicación son un grupo de compuestos estructuralmente relacionados con el ácido okadaico (AO), que fue el primer compuesto asociado a este tipo de toxicidad.

1.2.3.1.-Toxinas del grupo del ácido okadaico (DSP, Diarrhetic Shellfish Poisoning).

El ácido okadaico y sus derivados, las dinofisistoxinas (DTX), son compuestos lipófilos que se acumulan en el tejido adiposo de los mariscos (Figura 9). Dentro de las DTX se pueden diferenciar los derivados “libres” (DTX1 y DTX2) y los esterificados (DTX3 en moluscos y DTX4-6 y ésteres diol en microalgas) (Hu *et al.*, 1995; Suzuki *et al.*, 1999; Suárez-Gómez *et al.*, 2001; Quilliam, 2003).

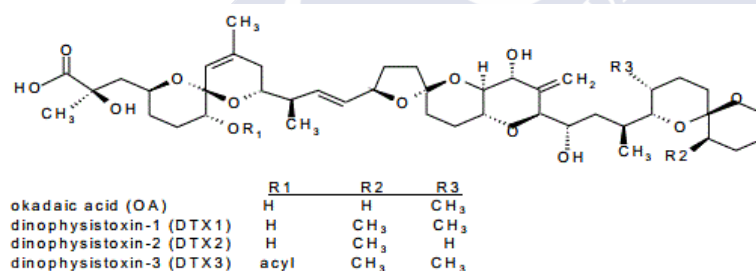


Figura 9. Estructura química del ácido okadaico y de las dinofisistoxinas (Yasumoto *et al.*, 2001; Ciminiello *et al.*, 2002).

El AO es un inhibidor de la actividad fosfatasa serina/treonina, principalmente, de la proteína fosfatasa 1 (PP1) y la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (Bialojan y Takai, 1988). Estas fosfatasas están implicadas en la regulación de múltiples procesos celulares ya que modulan el grado de fosforilación o desfosforilación de las proteínas (Fernández *et al.*, 2002). De modo que, en humanos, la diarrea es causada por la hiperfosforilación de las proteínas que controlan la secreción de sodio por las células intestinales, o bien por una excesiva fosforilación de las partes del citoesqueleto que regulan la permeabilidad a los solutos, produciéndose una pérdida pasiva de fluidos (Fiorentini *et al.*, 1996; Tripuraneni *et al.*, 1997). Estudios realizados han observado que tanto el AO como la DTX1 son promotores tumorales (Fujiki *et al.*, 1988) y además, el AO presenta una marcada actividad mutagénica (Fessard *et al.*, 1996).

Los principales productores son dinoflagelados de los géneros *Dinophysis* (*D. acuminata*, *D. fortii*, *D. caudata*, *D. acuta*, entre otras) (Yasumoto *et al.*, 1980; Lee *et al.*, 1989) y del género *Prorocentrum* (*P. lima*, *P. belizeanum*, *P. maculosum*) (Zhou y Fritz, 1994; Quilliam *et al.*, 1996; Morton, 1998).

La presencia en el medio marino de fitoplancton tóxico implica que aquellos moluscos bivalvos que se alimentan por filtración incorporan las células del plancton y acumulan las toxinas (FAO, 2004). Una vez que las toxinas han sido ingeridas, pueden ser absorbidas y acumuladas como tal o transformadas. Las transformaciones originan compuestos de distintas polaridades y con diversas eficiencias de absorción y velocidad de eliminación, en función de la diferente capacidad para atravesar las membranas celulares. Asimismo, los compuestos generados presentan una toxicidad diferente a la de la toxina original (Fernández Cañamero, 2008). Las toxinas del grupo del ácido okadaico sufren tres tipos de transformaciones: (a) hidrólisis de las formas conjugadas, compuestos tipo DTX4, DTX5 y diol-éster (Quilliam *et al.*, 1996; Windust *et al.*, 1997, 2000; Fernández *et al.*, 1998); (b) oxidación del diol-éster (Windust *et al.*, 1997, 2000) y (c) acilación de las toxinas con el ácido carboxílico libre (Suzuki *et al.*, 1999; Suzuki y Mitsuya, 2001).

Los estudios sobre la distribución de las toxinas en los diferentes órganos y tejidos de los moluscos coinciden en señalar que las toxinas DSP se acumulan principalmente en la glándula digestiva (Yasumoto *et al.*, 1978; Murata *et al.*, 1982; Stabell *et al.*, 1992; Pillet *et al.*, 1995; Bauder *et al.*, 2001; Hess *et al.*, 2003; Blanco *et al.*, 2007). Es decir, no existe transferencia de toxinas desde la glándula digestiva hacia otros órganos o tejidos, o por lo menos, la contribución de los tejidos no viscerales a la cantidad total de toxina es insignificante (Suzuki *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2007). Por otra parte, algunos estudios manifiestan que existe cierta contribución de los tejidos no viscerales a la carga total de toxina en varias especies de moluscos (Pillet *et al.*, 1995; Bauder *et al.*, 2001; Hess *et al.*, 2003).

Los moluscos no retienen las toxinas indefinidamente, de manera que son eliminadas al cabo de cierto tiempo desde la ingestión de las células tóxicas. El proceso de depuración de las toxinas por parte de los bivalvos varía tanto con el tipo de toxinas o la especie de bivalvo como con las condiciones ambientales tales como la temperatura y la disponibilidad de alimento. En general, se asume que las bajas temperaturas dan lugar a bajas tasas de depuración (Shumway y Cembella, 1993) pero no existen evidencias que sustenten este hecho.

La cinética de depuración de especies de moluscos afectados por toxinas DSP ha sido estudiada por varios autores desarrollándose diversos modelos (Blanco *et al.*, 1995, 1997, 1999; Morono *et al.*, 1998^a, 1998^b; Silvert *et al.*, 1998). En situaciones simples,

cuando la mayor parte de las toxinas se acumulan en un único órgano, o cuando todos los órganos tienen una tasa de depuración similar, la hipótesis empleando un modelo de cinética de un compartimento es satisfactoria. En otras situaciones se emplean modelos de dos compartimentos cuando las toxinas se distribuyen entre diferentes órganos y presentan diferentes tasas de depuración.

Se ha llegado a la conclusión de que la mejor forma de describir dicho proceso es mediante un modelo de dos compartimentos, incluso cuando únicamente se considera la depuración desde la glándula digestiva (Figura 10). El modelo de dos compartimentos desarrollado para las toxinas DSP por Blanco *et al.* (1999) consta de un primer compartimento con una tasa de desintoxicación más rápida y un segundo compartimento con una tasa más lenta, y entre ambos, existe una transferencia de toxinas desde el primer al segundo compartimento. El modelo sugiere que la toxina está presente en dos formas en la glándula digestiva, siendo una de ellas más difícil de eliminar que la otra. Esto podría deberse a que los dos tipos celulares (digestivo y secretor) presentes en la glándula digestiva tienen diferentes capacidades de acumulación, sin embargo, esta hipótesis quedó descartada en el trabajo de Rossignoli y Blanco (2008). Otra hipótesis sería la existencia de un ligamiento entre la toxina y algún componente de la célula. Rossignoli y Blanco (2010) observaron que el AO se encuentra unido a una proteína, probablemente, una lipoproteína de alta densidad que forma un complejo con un tamaño estimado entre 30 y 300 kDa.

1.2.3.2.- Azaspirácidos (AZA).

Son un grupo de toxinas caracterizadas por presentar una única estructura que incluye un anillo de unión azaspiro, una amina cíclica y un ácido (Satake *et al.*, 1998). Actualmente se han descrito más de 20 análogos pertenecientes a este grupo así como ésteres de metilo (Rehmann *et al.*, 2008). El mecanismo de acción de estas toxinas todavía no se ha determinado.

En los primeros estudios se consideró que el principal responsable de la producción de estas toxinas era el dinoflagelado heterotrófico *Protoperidinium crassipes* (James *et al.*, 2003), en el año 2009, el dinoflagelado fotosintético *Azadinium spinosum* se identificó como productor primario de los AZA (Tillmann *et al.*, 2009), sugiriendo que *Protoperidinium crassipes* es vector de estas toxinas.

1.2.4.- Toxinas lipofilicas no diarreogénicas.

En este grupo se incluyen toxinas cuya solubilidad es similar a las descritas en el grupo anterior pero, atendiendo a los efectos biológicos, carecen de efectos diarreogénicos (Ogino *et al.*, 1997; FAO, 2004).

1.2.4.1.- Pectenotoxinas (PTX).

Las pectenotoxinas toman su nombre de la vieira *Patinopecten yessoensis*, de la cual fueron aisladas por primera vez (Yasumoto *et al.*, 1984, 1985). Su estructura recuerda a la del AO por poseer, al igual que éste, éteres cíclicos y un grupo carboxílico, sin embargo, en la mayoría de las PTX el residuo carboxílico se encuentra en forma de lactona macrocíclica (Daiguji *et al.*, 1998). Se cree que los organismos productores de estas toxinas son varias especies del género *Dinophysis*.

1.2.4.2.- Yesotoxinas (YTX).

Son poliéteres sulfatados aislados a partir de la glándula digestiva de la vieira *Patinopecten yessoensis* (Murata *et al.*, 1987). Sus principales productores son los dinoflagelados *Protoceratium reticulatum* (Satake *et al.*, 1997), *Lingulodinium polyedrum* (Draisci *et al.*, 1999) y *Gonyaulax spinifera* (Mori *et al.*, 2003).

1.2.5.- Toxinas neurotóxicas (NSP, *Neurotoxic Shellfish Poisoning*).

Las principales responsables son un grupo de toxinas, las brevetoxinas, que se ligan al canal de sodio produciendo su apertura inapropiada e impidiendo su inactivación. Debido a esto, existe una gran entrada de sodio al interior celular y se altera el potencial de membrana. El organismo productor de estas toxinas es el dinoflagelado *Gymnodinium breve*.

1.2.6.- Ciguatera (CFP, *Ciguatera Fish Poisoning*).

La ciguatera es una intoxicación que se caracteriza por presentar a los peces como vector de transmisión. El nombre de ciguatera procede del nombre común de la primera especie identificada como causante de la intoxicación, el molusco *Turbo pica*, que recibe el nombre de cigua en Cuba (FAO, 2007). Son compuestos lipídicos poliéteres solubles que se originan debido a la biotransformación de sus precursores, las gambiertoxinas (Lehane y Lewis, 2000). El organismo productor de estas toxinas es el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*.

1.2.7.- Palitoxina.

Se trata de una neurotoxina que actúa sobre la bomba Na^+/K^+ de la membrana plasmática y también sobre la bomba H^+/K^+ (Farley *et al.*, 2001). De esta manera, produce cambios en la permeabilidad de la membrana de la célula y modifica la composición iónica del interior celular provocando una despolarización y su muerte

(Muramatsu *et al.*, 1984). Es producida por especies del género *Ostreopsis* (Taniyama *et al.*, 2003).

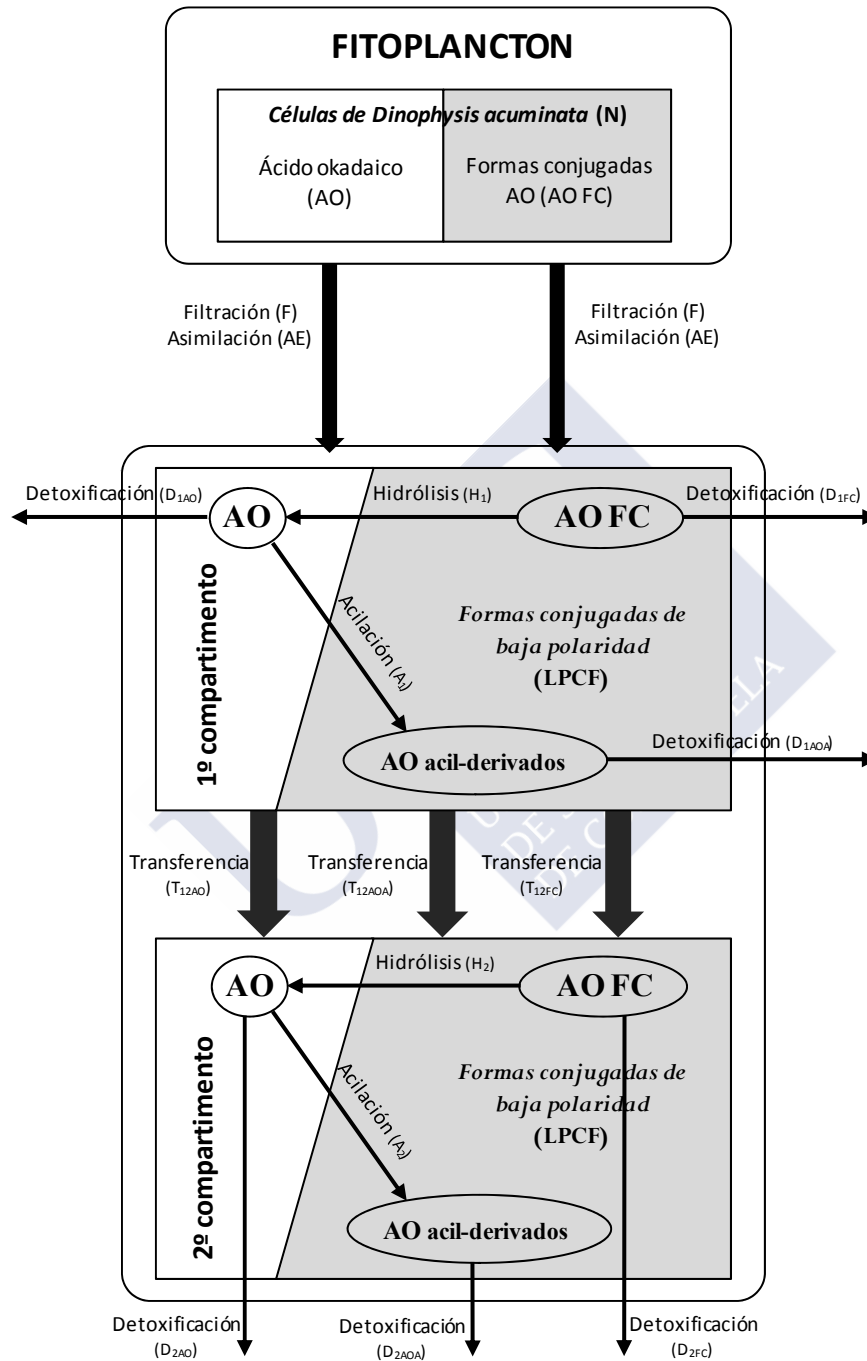


Figura 10. Representación esquemática del modelo de dos compartimentos que explica la cinética de eliminación de toxinas DSP en moluscos bivalvos (Modificado de Moroño *et al.*, 2003).

1.3.- TRANSPORTADORES ABC (*ATP-BINDING CASSETTE*).

Los transportadores ABC (*ATP-Binding Cassette*) son proteínas de membrana que acoplan la hidrólisis del ATP al transporte de sustratos a través de la membrana celular. Presentan dominios de unión a ATP característicos responsables de su denominación (*ATP Binding Cassette*).

En 1982, el laboratorio de Giovanna Ames clonó y secuenció el primer transportador ABC: la histidina permeasa. Desde entonces esta familia de transportadores ha ido creciendo y actualmente constituyen una gran familia de proteínas altamente conservadas a lo largo de la evolución y muy ubicuas, presentes tanto en bacterias como en organismos superiores. El término transportador ABC fue propuesto en 1992 por Christopher Higgins.

Es importante destacar la diferencia entre proteínas ABC y transportadores ABC. El término proteína ABC se refiere a proteínas que contienen un dominio de unión a ATP y/o de hidrólisis del ATP y que participan en muchos procesos fisiológicos no necesariamente (aunque sí normalmente) relacionados con el transporte. Por otro lado, un transportador ABC se forma cuando dicha actividad ATPasa se asocia con un dominio hidrofóbico de membrana (Young y Holland, 1999).

Los transportadores ABC son vitales para cualquier sistema vivo y están implicados en el transporte de una amplia variedad de sustratos desde azúcares, iones, lípidos, péptidos, toxinas, antibióticos, xenobióticos hasta proteínas de alto peso molecular (Higgins, 1992). En procariotas los transportadores ABC absorben compuestos esenciales que no pueden ser obtenidos por difusión (azúcares, vitaminas, iones metálicos) en la célula. En eucariotas, la mayor parte de las proteínas ABC mueven compuestos desde el citoplasma al exterior de la célula o al interior de compartimentos intracelulares como el retículo endoplasmático, mitocondria y peroxisoma (Dean *et al.*, 2001a).

Los transportadores ABC atendiendo a la dirección del transporte pueden clasificarse en:

- *Importadores ABC*: característicos de procariotas. Necesitan de una proteína PBP (Proteína de unión periplasmática) para que el transporte sea eficaz (Jones y George, 2004).
- *Exportadores ABC*: presentes en procariotas y eucariotas. Reclutan sus sustratos directamente del citoplasma y los exportan a través de la membrana citoplasmática de las células o de las membranas de los orgánulos (Hollenstein *et al.*, 2007).

En procariotas se han manteniendo los dos tipos de sistemas mientras que en eucariotas sólo está presente el sistema de exportación, ello sugiere que la función de absorción se separó de la función de exportación antes de la divergencia entre procariotas y eucariotas y esa separación ocurrió una sola vez en la historia de los sistemas ABC (Saurin *et al.*, 1999).

Ciertos sistemas ABC no están implicados directamente en el transporte sino que participan en procesos celulares tales como, por ejemplo, la reparación del DNA (Thiagalingam y Grossman, 1993) o la expresión de genes (Belfield *et al.*, 1995). Estos sistemas carecen del dominio hidrofóbico de membrana.

1.3.1.- Organización estructural de los transportadores ABC.

Los transportadores ABC se componen de cuatro dominios: dos dominios transmembrana hidrofóbicos (TMD) y dos dominios citosólicos de unión a nucleótido ó ATP hidrofílicos (NBD, por sus siglas en inglés *Nucleotide Binding Domain*) (Higgins, 1992). Estos cuatro dominios conforman la unidad básica funcional de los transportadores ABC y pueden expresarse como polipéptidos independientes, como sucede en la mayoría de los transportadores ABC de bacterias, o bien como una única cadena polipeptídica o como pares de dominios en los sistemas eucariotas (Hyde *et al.*, 1990; Higgins, 1992).

Los dominios transmembrana están formados por varios segmentos hidrofóbicos con estructura α -hélice que atraviesan la membrana. La mayoría de los transportadores ABC tienen seis segmentos en cada TMD pero existen variaciones (Dean *et al.*, 2001b). Los TMD constituyen la vía a través de la cual se lleva a cabo el transporte del sustrato, y determinan la especificidad por el sustrato puesto que mutaciones en estas regiones modifican la selectividad del transportador por el sustrato (Zhou *et al.*, 1999).

Los dominios NBD están muy conservados en todas las proteínas ABC, unen e hidrolizan el ATP proporcionando la energía necesaria para el transporte de sustratos (Dean *et al.*, 2001b; Higgins, 2007). Son hidrofílicos, citosólicos y contienen tres motivos muy conservados: Walker A, Walker B y Secuencia Firma de las ABC o motivo C. Además de dichos motivos existen otros como el *A-loop*, *Q-loop*, *D-loop*, y el *H-loop/Switch region* (Figura 11).

El motivo Walker A, también denominado *Loop* de unión al fosfato (*P-loop*) o *Loop* rico en glicina (Smith y Rayment, 1996), se caracteriza por presentar la secuencia GXXGXGK(S/T) (siendo X cualquier aminoácido). Este motivo forma una horquilla que se une a los fosfatos α y β de los nucleótidos di- o tri- fosfato (ATP o ADP). El motivo Walker B se compone de hhhhD, donde h suele ser un aminoácido hidrofóbico

(Takahashi *et al.*, 2005). Este motivo provee el residuo carboxilato que coordina y estabiliza el Mg^{2+} , el cual es un cofactor en la hidrólisis del ATP, además de participar en el mantenimiento de la geometría del sitio activo (Schneider y Hunke, 1998; Moody *et al.*, 2002). Esta región del Walker B está precedida por el tercer motivo: motivo C, característico y exclusivo de los miembros de la familia ABC y que contiene la secuencia consenso LSGGQ(Q/R/K)QR. Su función parece ser la de transmitir señales desde el NBD al TMD (Borges-Walmsley *et al.*, 2003).

A parte de estos tres motivos conservados existen otros localizados dentro del NBD. El A-loop situado aproximadamente 25 aminoácidos antes del Walker A contiene un residuo aromático que interactúa con el anillo de adenina del ATP. Este motivo es esencial para la unión e hidrólisis del ATP (Ambudkar *et al.*, 2006). El Q-loop se caracteriza por presentar un residuo invariante de glutamina (Gln, Q) situado entre el Walker A y el motivo C (Takahashi *et al.*, 2005). El D-loop está formado por un residuo de ácido aspártico (Asp, D), se localiza después del Walker B y está involucrado en la actividad catalítica y en la intercomunicación de los sitios activos (Schmitt y Tampé, 2002). El H-loop con un residuo de histidina (His, H) necesario para la hidrólisis de ATP y la actividad de transporte (Shyamala *et al.*, 1991; Nikaido y Ames, 1999) aunque no para la unión del ATP (Shyamala *et al.*, 1991; Benabdelhak *et al.*, 2005; Hofacker *et al.*, 2007).

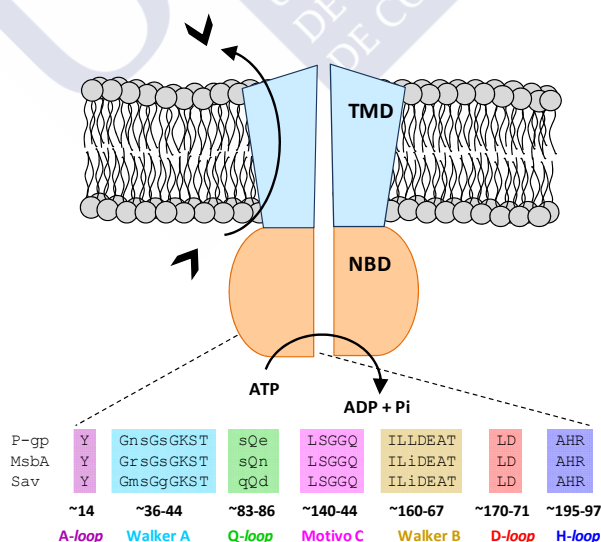


Figura 11. Estructura de los transportadores ABC. Las proteínas ABC están formadas por dos dominios transmembrana (TMD) y dos dominios de unión a ATP (NBD). Los TMD varían considerablemente entre las diferentes proteínas ABC sin embargo los NBD contienen varios motivos altamente conservados: Walker A/P-loop, Motivo C, Walker B, A-loop, Q-loop, D-loop, H-loop/Switch region. P-gp: P-glucoproteína, MsbA: *Bacterial ABC lipid flippase*, Sav: Transportador ABC de *Staphylococcus aureus* (Modificado de Linton, 2007).

1.3.2.- Mecanismo de transporte.

Todos los transportadores ABC catalizan el transporte de sustratos a través de la membrana biológica. Sin tener en cuenta la naturaleza del sustrato se han propuesto dos modelos que explican este mecanismo. El primero, conocido como el Modelo del Ciclo Catalítico Alternante, sugiere la existencia de un ciclo catalítico alternante entre los dos NBD durante la hidrólisis del ATP, es decir, los dos sitios de unión a ATP son necesarios para el funcionamiento del transporte y para la hidrólisis del ATP, pero ambos sitios no hidrolizan el ATP al mismo tiempo sino que se alternan (Senior *et al.*, 1995). El modelo asume que la principal fuente de energía para el transporte procede de la hidrólisis del ATP, y los NBD al funcionar de manera alterna están acoplados a distintas etapas del ciclo de transporte (Figura 12).

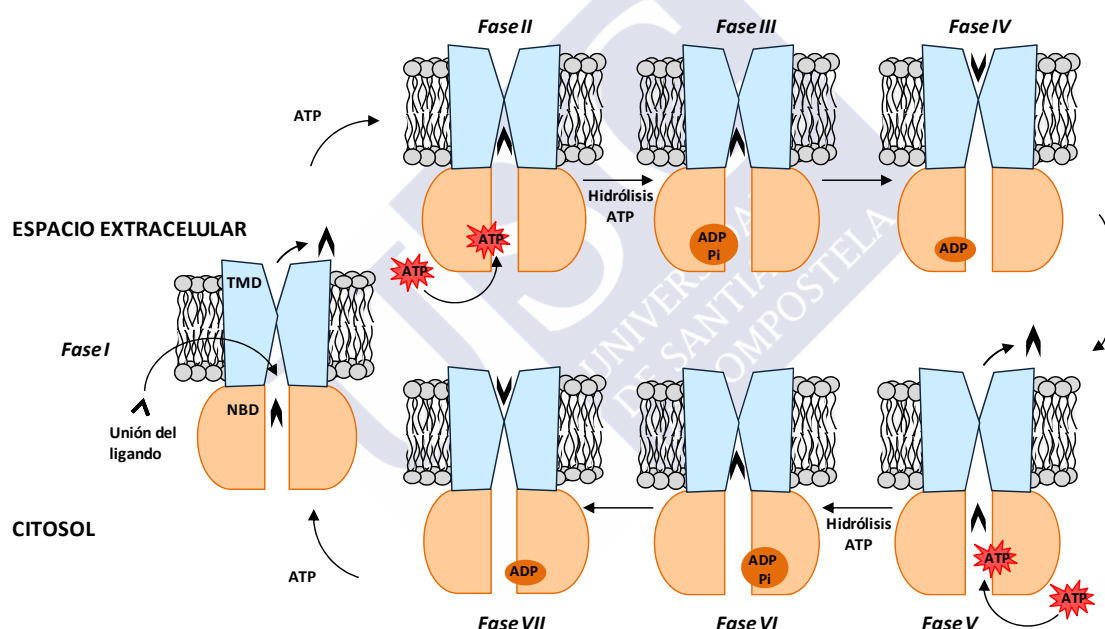


Figura 12. Modelo del Ciclo Catalítico Alternante. Cada dominio de unión a ATP (NBD) está formado por dos sitios de unión. Cada dominio transmembrana (TMD) puede exhibir una zona de unión de alta afinidad (intracelular) y una de baja afinidad (extracelular) al ligando. Durante el transporte, el ATP se une al NBD, provocando las interacciones del ligando o molécula a transportar con la zona de unión de alta afinidad intracelular (*Fase I-II*). Se hidroliza el ATP (*Fase II-III*) y la liberación del fosfato inorgánico (P_i) conduce al ligando a la zona de baja afinidad extracelular del mismo dominio por donde puede ser liberado (*Fase III-IV*). Como consecuencia de la unión del ADP, y las interacciones entre los NBD, el ATP se une al NBD que se encuentra vacío. Ello induce los cambios conformacionales (*Fase IV-V*) de manera que el dominio unido al NBD exhibe la zona de unión de alta afinidad intracelular. El ligando se une y el ATP se hidroliza (*Fase V-VI*). El P_i se libera y el ligando pasa a la zona de unión de baja afinidad extracelular y se libera (*Fase VII-I*). La liberación del ADP y la expulsión del ligando devuelven al transportador a su configuración inicial (Modificado de Borges-Walmsley y Walmsley, 2001).

Estudios posteriores sugieren: primero, que es la unión del ATP más que su hidrólisis lo que ocasiona los cambios conformacionales en el transportador y promueve el transporte de sustratos (Higgins, 1992); segundo, que en algunos transportadores ABC (como la subfamilia ABCC) sus dos NBD no tienen la misma habilidad para la unión e hidrólisis de ATP; y tercero, las dos zonas de unión a ATP se encuentran en la interfaz del dímero del NBD por lo que los dos NBD actúan en un sólo paso. Estos datos llevaron a proponer el segundo modelo llamado Interruptor de ATP (*ATP-switch*). Este modelo implica una comunicación, en ambas direcciones, entre los NBD y los TMD. Se basa en dos cambios alternantes en la conformación de los NBD: la formación de un dímero cerrado tras la unión de dos moléculas de ATP en la interfaz del dímero, y la disociación del dímero abierto tras la hidrólisis del ATP y la liberación de fosfato inorgánico (P_i) y ADP. Existe una cooperatividad entre las zonas de unión a ATP que puede estar regulado por señales procedentes de los TMD. El paso entre la configuración cerrada y abierta del dímero provoca los cambios conformacionales de los TMD necesarios para el transporte de los sustratos a través de la membrana (Higgins y Linton, 2004). El transportador en su estado basal tiene los NBD en configuración de dímero abierto, con baja afinidad por el ATP. Este mecanismo de transporte se puede resumir en cuatro fases (Figura 13):

- *Fase I:* El ligando o molécula que se va a transportar se une a la zona de alta afinidad formada por los TMD y abre la conformación dimérica del NBD provocando un aumento de la afinidad por el ATP. La forma libre de los transportadores ABC presenta una elevada afinidad por el ligando de tal modo que la unión de éste a los TMD provoca un cambio conformacional en los NBD.

- *Fase II:* La unión del ATP promueve el cierre del dímero del NBD el cual a su vez provoca un cambio conformacional en los TMD suficiente para transportar el ligando. Todas las proteínas ABC están formadas por dos dominios de unión a nucleótido por lo que *a priori* son dos moléculas de ATP las que se unen (Chen *et al.*, 2001).

- *Fase III:* La hidrólisis de ATP inicia la disolución del dímero cerrado. Cada uno de los eventos hidrolíticos tiene diferente función, uno de ellos está implicado directamente en el cambio conformacional de los TMD que permiten el traslado de los sustratos al exterior de la célula, mientras que el segundo es necesario para devolver al transportador su estado original.

- *Fase IV:* La liberación del fosfato inorgánico (P_i) y el ADP devuelve al transportador su configuración inicial de alta afinidad por el sustrato (Linton y Higgins, 2007).

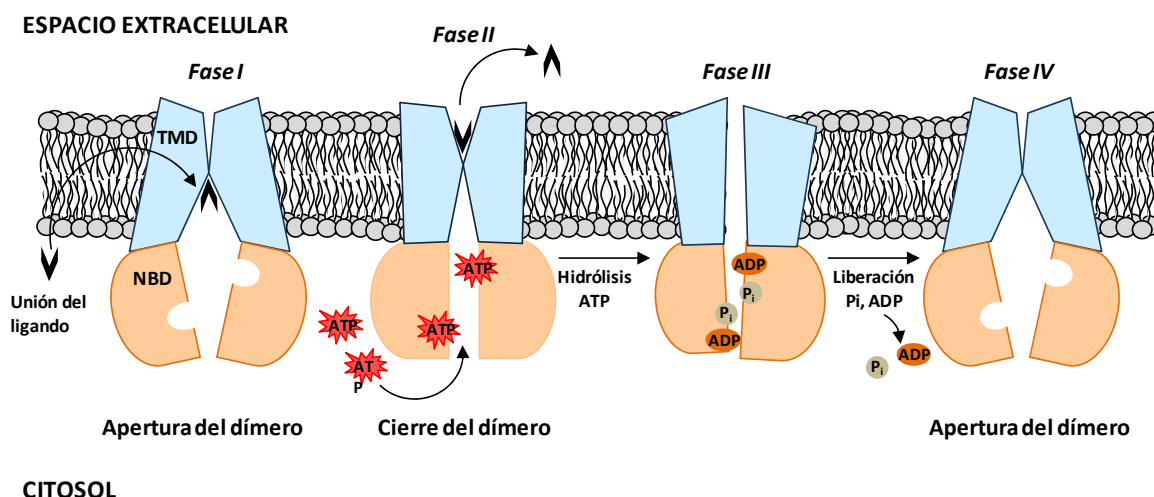


Figura 13. Mecanismo de transporte Interruptor de ATP (*ATP-switch*) de las proteínas ABC. El ligando se une en el espacio formado entre los dos TMD y provoca un cambio conformacional en los NBD que resulta en un aumento de la afinidad por el ATP. Las dos moléculas de ATP se unen a los NBD. La energía liberada por el cierre del dímero del NBD causa un cambio conformacional en los TMD y el ligando se expulsa al exterior de la célula. La hidrólisis de ATP desencadena la disolución del dímero cerrado y provoca el cambio conformacional de los TMD. Finalmente el fosfato inorgánico y el ADP se liberan y devuelven al transportador su configuración abierta. (Modificado de Linton y Higgins, 2007).

La evidencia de que las interacciones entre los NBD y TMD ocasionan los cambios conformacionales en el transportador se han puesto de manifiesto en varios estudios. En la proteína MRP1 de humanos mutaciones en aminoácidos específicos situados en los segmentos citoplasmáticos localizados entre el segmento transmembrana (TM) 7 y 8 del TMD1 y entre el TM13 y TM14 del TMD2 demuestran esta comunicación ya que impiden la transición de un estado de alta a baja afinidad de unión al sustrato (Koike *et al.*, 2004). También se han identificado regiones y aminoácidos específicos en MRP claves para el reconocimiento y transporte de los sustratos. La mayoría de los estudios se centran en la proteína MRP1 de humanos y en menor medida en las proteínas MRP2 y MRP3. Empleando estudios de mutagénesis se identificaron aminoácidos implicados en el transporte de sustratos en la proteína MRP1. El segmento transmembrana 17 está muy conservado entre los miembros de la familia ABCC, contiene muchos residuos ácidos y polares y/o aromáticos, entre ellos el residuo de triptófano (Trp¹²⁴⁶) es crucial en la especificidad por el sustrato (Ito *et al.*, 2001b; Koike *et al.*, 2002). El TM6 es un segmento menos conservado en esta familia de transportadores, presenta muchos residuos polares y entre ellos la lisina (Lys³³²), la histidina (His³³⁵) y el ácido aspártico (Asp³³⁶) que favorecen la interacción de la proteína con sus sustratos más hidrofílicos (Haimeur *et al.*, 2002).

Otros aminoácidos, que por sus características físicas y químicas, intervienen en el transporte de los sustratos son algunos residuos de prolina presentes en la MRP1 de humanos (Koike *et al.*, 2004). En cuanto a la proteína MRP2, también se han identificado residuos aminoácidos implicados en el transporte localizados en los TM6, 11, 14, 16 (Ryu *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001c) además del TM17 (Ito *et al.*, 2001a).

1.3.3.- Clasificación de la familia ABC.

En humanos se han identificado 48 transportadores ABC divididos en siete grupos (Figura 14) según la homología de su secuencia con designación desde ABC-A hasta ABC-G (Hughes, 1994; Allikmets *et al.*, 1996).

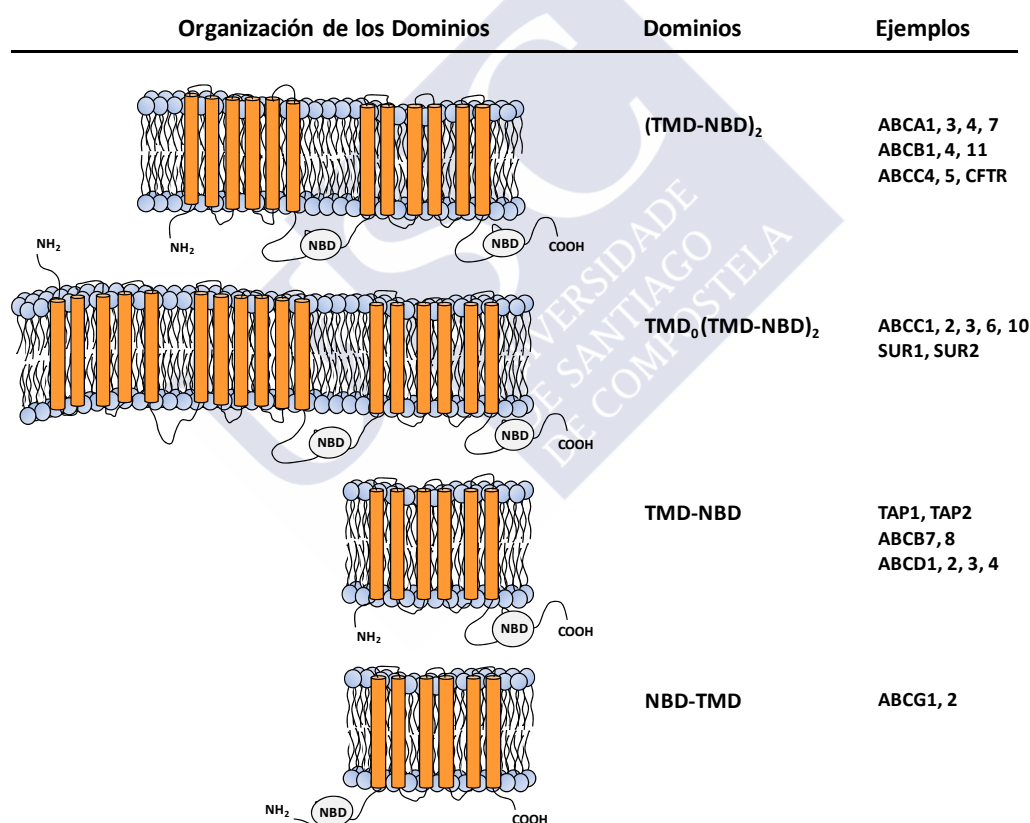


Figura 14. Organización de los dominios de proteínas ABC. Los dominios transmembrana (TMD) aparecen como segmentos transmembrana en color naranja y los dominios de unión a ATP (NBD) están señalados.

La subfamilia *ABCA* contiene 12 miembros identificados hasta la fecha en humanos. El papel principal es el transporte de lípidos a través de la membrana plasmática y la membrana de orgánulos celulares, también participan en el desarrollo de

la resistencia múltiple frente a fármacos o multirresistencia frente a fármacos (*Multidrug resistance*, MDR) mediando el almacenamiento de los fármacos en lisosomas y promoviendo su expulsión de la célula (Albrecht y Viturro, 2007).

La *subfamilia ABCB* (MDR/TAP) comprende 11 miembros. A ella pertenece la P-gp o MDR1 que fue el primer gen *ABC* clonado y caracterizado por su capacidad de conferir multirresistencia frente a fármacos (MDR) en células cancerígenas. Otros miembros de este grupo son los genes *ABCB2* y *ABCB3* (TAP1 y TAP2) con una topología distinta a la del transportador clásico. Presentan un único TMD y un NBD y están implicados en el transporte de péptidos al interior del retículo endoplasmático donde forman complejos con moléculas HLA de Clase I.

La *subfamilia ABCC* (CFTR/MRP) está formada por las proteínas asociadas a la multirresistencia frente a fármacos (MRP) que junto con el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR/ABCC7) y los receptores sulfonilurea (SUR1/ABCC8 y SUR2/ABCC9) forman los 12 miembros de esta subfamilia. Algunos transportadores contienen un dominio transmembrana adicional con un extremo amino-terminal extracelular además de la unidad básica funcional compuesta por dos dominios transmembrana (TMD) seguido cada uno por un dominio de unión a ATP (NBD). Se localizan en la membrana plasmática pero también en el retículo endoplasmático, de lo que se deduce que pueden actuar tanto en la expulsión de sustratos fuera de la célula como en el secuestro intracelular de estas en vesículas citoplasmáticas (Tan *et al.*, 2000). Llevan a cabo funciones de transporte de iones, secreción de toxinas y transducción de señales. Además del papel en la multirresistencia frente a fármacos algunas proteínas funcionan como un transportador activo primario de diversos aniones orgánicos, muchos de ellos se forman mediante biotransformación de endo- y xenobióticos por enzimas de conjugación de la fase II, como la glutatión S-transferasa. Esta subfamilia se describirá más profundamente en el capítulo I.

La *subfamilia ABCD* consta de 4 proteínas con una topología particular (un único TMD y un NBD). Se localizan en peroxisomas y aunque su función no está clara parece que participan en el transporte de ácidos grasos de cadena larga.

Las *subfamilias ABCE* y *ABCF* con uno y tres miembros respectivamente, contienen proteínas ABC que no son transportadoras, es decir, tienen un dominio de unión a ATP pero carecen de dominio transmembrana.

La *subfamilia ABCG* (*White*) contiene 5 transportadores cuya organización de los dominios es inversa a la del resto de los transportadores ABC, con un único NBD en

el extremo amino y un TMD en el extremo carboxilo. En humanos todos los miembros de esta subfamilia están formados por semi-transportadores tipo NBD-TMD aunque se han descrito transportadores completos, con la organización (NBD-TMD)₂, en algunos organismos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*. La mayoría de los miembros (ABCG1, ABCG4, ABCG5 y ABCG8) están implicados en el transporte de lípidos, ácidos biliares, colesterol y otros esteroides mientras que la proteína ABCG2 está relacionada con la multirresistencia frente a fármacos. En el capítulo II se explicará en más detalle esta subfamilia.

Los transportadores ABC están asociados a ciertas enfermedades algunas de ellas como la fibrosis quística, la adrenoleucodistrofia, la colestasis hepática, la distrofia macular de Stargardt y la enfermedad de Tangier (Gottesman y Ambudkar, 2001; Annilo *et al.*, 2006) (Tabla 1). Algunas proteínas ABC también están asociadas al fenómeno de resistencia a determinados fármacos, en la actualidad se conocen algunos transportadores que confieren resistencia a compuestos citotóxicos: ABCA2, ABCA3, ABCB1, ABCB4, ABCB5, ABCB11, ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC4, ABCC5, ABCC6, ABCC10 y ABCC11 y ABCG2 (Gottesman y Ambudkar, 2001; Albrecht y Viturro, 2007).

Tabla 1. Lista de transportadores ABC asociados a enfermedades humanas (Modificado de Gottesman y Ambudkar, 2001).

SUBFAMILIA	GEN	FENOTIPO
ABCA	ABCA1	Enfermedad de Tangier
	ABCA4	Enfermedad de Stargardt, Distrofia de conos y bastones, Retinitis pigmentosa, Degeneración macular asociada a la edad
	ABCA3	Enfermedad pulmonar intersticial del recién nacido
	ABCA12	Ictiosis Arlequin
ABCB (MDR/TAP)	ABCB4	Colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo 3 (PFIC3)
	ABCB2, ABCB3	Granulomatosis de Wegener
	ABCB7	Anemia sideroblástica con ataxia espinocerebelar
	ABCB11	PFIC2
ABCC (CFTR/MRP)	ABCC2	Síndrome de Dubin-Johnson
	ABCC6	Pseudoxantoma elástico
	ABCC7	Fibrosis quística
	ABCC8	Hiperinsulinemia hipoglucemiante familiar infantil
ABCD	ABCD1	Adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X
	ABCD3	Síndrome de Zellweger
ABCG (White)	ABCG5, ABCG8	Sitosterolemia

1.3.4.- Multirresistencia frente a xenobióticos (MXR) en organismos acuáticos.

Muchos de los transportadores antes mencionados tienen un papel importante en lo que se denomina multirresistencia frente a fármacos (*Multidrug Resistance*, MDR). Estos sistemas catalizan la expulsión de compuestos biogénicos y xenobióticos, no relacionados estructural y funcionalmente, desde el citoplasma o la membrana interna hacia el medio externo.

La mayoría de las células tumorales, de manera innata o adquirida, terminan siendo resistentes a múltiples agentes quimioterapéuticos, con estructura y mecanismos de acción diferentes. El fenotipo MDR se caracteriza por la resistencia cruzada a fármacos estructuralmente diferentes, la reducción en la acumulación intracelular del fármaco y el aumento de la expresión de ciertas proteínas transportadoras de membrana pertenecientes a la superfamilia de proteínas ABC (Gottesman *et al.*, 2002). Inicialmente el fenómeno MDR se relacionó con la proteína de membrana P-gp, pero posteriormente se descubrieron otras proteínas: MRP y ABCG causantes del fenotipo celular multirresistente.

La importancia ambiental de los transportadores ABC fue reconocida por primera vez por Kurelec, quien demostró que el transportador P-gp protegía a los organismos acuáticos frente a diversos contaminantes. Esta protección la llamó resistencia múltiple frente a xenobióticos o multirresistencia frente a xenobióticos (*Multixenobiotic resistance*, MXR) para resaltar la capacidad de proteger las células u ofrecer resistencia frente a químicos extraños (Kurelec, 1992).

Es importante definir el término xenobiótico que hace referencia a aquellos compuestos químicos o sustancias extrañas o ajenas a las que proceden de la composición o metabolismo de un organismo. Estos compuestos pueden ser tóxicos para el organismo por lo que normalmente son metabolizados para su posterior eliminación. Los xenobióticos sufren en el organismo un metabolismo en dos fases: fase I y fase II. En una primera fase, el compuesto se prepara mediante, oxidación, reducción o formación de un grupo hidroxilo para la segunda fase en la que otras enzimas, transferasas, añaden grupos de metilo, acetilo, glucurónido, acetil cisteína, etc. al compuesto, es decir, lo conjugan. Este sistema funciona de forma prácticamente universal desde arqueobacterias hasta la especie humana (Leslie *et al.*, 2005). Son varios los autores que han estudiado su funcionamiento en bivalvos marinos demostrando la inducción del sistema frente a diversos contaminantes (Eufemia y Epel, 2000; McFadzen *et al.*, 2000; Smital *et al.*, 2000; Eufemia *et al.*, 2002; Pain y Parant, 2003a; Franzellitti y Fabbri, 2006).



2. OBJETIVOS



El objetivo general de esta Tesis Doctoral es profundizar en el estudio de los genes de multirresistencia frente a xenobióticos en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Para ello se establecieron cuatro objetivos específicos:

1.- Demostrar la presencia de proteínas de las subfamilias ABCC y ABCG en *Mytilus galloprovincialis*. Para ello mediante técnicas de biología molecular (PCR, RACE, clonación y secuenciación) se obtendrán las secuencias completas de los cDNA que codifican para dichas proteínas, luego se identificarán residuos y regiones conservadas mediante la comparación con proteínas de las subfamilias ABCC y ABCG de otros organismos.

2.- Identificar genes de referencia adecuados para el estudio de la expresión de los genes que codifican para proteínas de las subfamilias ABCC y ABCG mediante transcripción inversa seguida de PCR en tiempo real cuantitativa (RT-qPCR). Dichos genes de referencia son necesarios para normalizar los datos de expresión.

3.- Estimar la expresión de los genes que codifican para proteínas de las subfamilias ABCC y ABCG en diferentes tejidos (glándula digestiva, branquia y manto) de *Mytilus galloprovincialis* mediante RT-qPCR, esto nos puede permitir conocer la importancia de cada uno de estos tejidos en los procesos de desintoxicación.

4.- Evaluar la expresión de los genes que codifican para proteínas de las subfamilias ABCC y ABCG en diferentes tejidos de *Mytilus galloprovincialis* afectados por un episodio nocivo por toxinas DSP, mediante RT-qPCR.





3. CAPÍTULO I:

**Clonación de los cDNA que codifican para
proteínas de la subfamilia ABCC
en *Mytilus galloprovincialis***



3.1.- INTRODUCCIÓN.

La **subfamilia ABCC (CFTR/MRP)** está formada en la especie humana por 12 miembros que comprenden varios transportadores conocidos como proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (*Multidrug Resistance-associate Protein*, MRP) (Tabla 2). En esta subfamilia se incluye la proteína ABCC7 (CFTR) que es un canal iónico de cloro y las proteínas ABCC8 y ABCC9 (SUR) que se unen a la sulfonilurea y regulan los canales de potasio involucrados en la regulación de la secreción de insulina. El resto de la familia, está compuesta por nueve proteínas MRP relacionadas con la multirresistencia. ABCC1, ABCC2 y ABCC3 transportan compuestos tóxicos conjugados con glutatión y otros aniones orgánicos. ABCC4, ABCC5, ABCC11 y ABCC12 son más pequeñas que el resto de genes MRP ya que carecen de un tercer dominio adicional y su extremo amino-terminal es intracelular (Borst *et al.*, 2000) (Figura 15).

Tabla 2. Lista de proteínas ABCC de humanos. Se detalla los nombres originales de los genes, su expresión y función (Modificado de Lorkowski y Cullen, 2002).

GEN	ALIAS	EXPRESIÓN	FUNCIÓN
ABCC1	MRP1	Pulmón, intestino, riñón, testículo, cerebro	Multirresistencia frente a fármacos
ABCC2	MRP2	Hígado, intestino, riñón	Flujo de salida de aniones orgánicos
ABCC3	MRP3	Glándula suprarrenal, páncreas, vesícula biliar, placenta	Multirresistencia frente a fármacos
ABCC4	MRP4	Próstata	Tranporte de nucleósidos
ABCC5	MRP5	Músculos esquelético y cardíaco	Tranporte de nucleósidos
ABCC6	MRP6	Riñón, hígado	Tranporte de péptidos
ABCC7	CFTR	Tejido exocrino, pulmón	Canal iónico de cloro
ABCC8	SUR	Páncreas	Receptor sulfonilurea
ABCC9	SUR2	Corazón, músculo	Receptor sulfonilurea
ABCC10	MRP7	Hígado	-
ABCC11	MRP8	Hígado	-
ABCC12	MRP9	Testículo, mamas	-

El primer miembro de esta familia descrito fue la MRP1 (ABCC1). Descubierta por Cole *et al.* (1992) en una línea celular de cáncer de pulmón multirresistente que no expresaba P-gp. En 1996, diferentes grupos identificaron un nuevo miembro que llamaron cMOAT (*Canalicular multispecific organic anion transporter*, Transportador canalicular multiespecífico de aniones orgánicos) (Beaudet y Gros, 1995; Paulusma *et al.*, 1996; Taniguchi *et al.*, 1996) que, posteriormente, se nombró como MRP2 ya que no estaba restringido a la membrana canicular de los hepatocitos. Empleando estudios

mediante la base de datos humana de EST se identificaron los miembros MRP3, MRP4, MRP5 y MRP6 (Kool *et al.*, 1997). A partir del año 2001 se identificaron los miembros MRP7, MRP8 y MRP9 (Bera *et al.*, 2001; Hopper *et al.*, 2001; Tammur *et al.*, 2001).

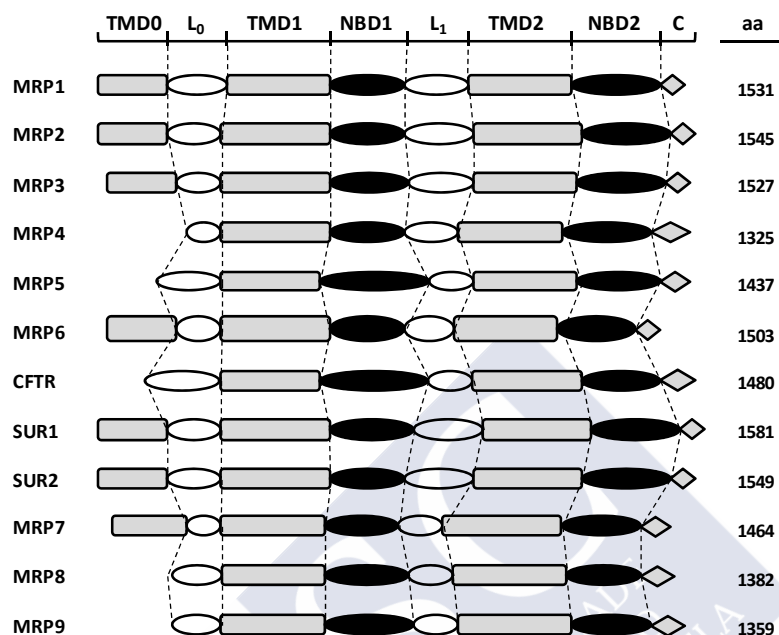


Figura 15. Comparación de los dominios en la subfamilia de transportadores ABCC. Se indican los dominios transmembrana: TMD0, TMD1, y TMD2 (rectángulo gris), los dominios de unión a ATP: NBD1 y NBD2 (elipse negra), los segmentos citoplasmáticos L₀ entre el TMD0 y TMD1 y L₁ entre el NBD1 y TMD2 (elipse blanca), y el extremo carboxi-terminal: C (rombo gris). aa: aminoácidos (Modificado de Hopper *et al.*, 2001).

La predicción de la topología de esta subfamilia de proteínas empleando métodos computacionales permitió identificar un dominio transmembrana adicional (TMD0) además de la unidad básica funcional formada por dos TMD y dos NBD en algunos miembros de esta subfamilia. Este tercer dominio consta de cinco segmentos hidrofóbicos con estructura α -hélice y con su extremo amino-terminal extracelular (Bakos *et al.*, 1996; Hipfner *et al.*, 1997). Basándose en el análisis estructural se puede clasificar las proteínas ABCC en dos grupos, aquellas que presenta el dominio transmembrana extra amino-terminal (ABCC1, ABCC2, ABCC3, ABCC6, ABCC8, ABCC9, ABCC10) y las que carecen de él como ABCC4, ABCC5, ABCC7, ABCC11 y ABCC12. Si se compara la secuencia aminoacídica de las proteínas ABCC con y sin el tercer dominio extra, existe una zona conservada entre el extremo amino-terminal de aquellas proteínas que carecen de este TMD0 y la parte carboxi-terminal del TMD0 en las proteínas que si lo presentan. En el gen *MRP1*, esta secuencia se sitúa en el extremo

5' del exón 6 lo que sugiere que los cinco primeros exones fueron adquiridos como resultado de la fusión de genes (Grant *et al.*, 1997). El papel que desempeña el tercer dominio extra junto con el segmento citoplasmático 0 (L_0) que une el TMD0 con el TMD1 no está claro, pero es necesario para el correcto funcionamiento y localización de la proteína (Bakos *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1998; Westlake *et al.*, 2005).

Independiente del número de dominios transmembrana, todos los miembros de esta subfamilia comparten ciertas características en sus NBD, sin embargo, en este grupo de proteínas ABC existen ciertas diferencias estructurales entre sus NBD. En concreto, la diferencia más obvia entre los dos NBD de las MRP es la delección conservada de 13 aminoácidos entre el motivo Walker A y el motivo C en el NBD1. En la mayoría de los transportadores ABC ambos NBD son casi idénticos y por tanto intercambiables sin afectar a su función. Al insertar la secuencia de 13 aminoácidos de P-gp/MDR1 en la zona correspondiente a la proteína MRP1 se elimina la alta afinidad de unión a ATP y se cambia la conformación del dominio (Gao *et al.*, 2000). Otra característica es que en la mayoría de los NBD después del motivo Walker B el aminoácido que le sigue es el glutamato (Glu, E), residuo esencial para la ruptura de la unión β - γ fosfodiéster del ATP. En las proteínas ABCC, este residuo está presente en el NBD2 pero el NBD1 está ocupado por aspartato (Asp, D), con excepción de CFTR en el cual es una serina (Ser, S). La función de este residuo de Glu (E) se ha estudiado en varios transportadores ABC, como la histidina permeasa (HisP) de *Escherichia coli* o en la P-gp de murinos, en los que la mutación de este residuo da lugar a una pérdida de la actividad ATPasa del transportador (Hung *et al.*, 1998; Urbatsch *et al.*, 2000; Moody *et al.*, 2002). En la proteína MRP1 la sustitución del Asp (D) por Glu (E) afecta a la unión e hidrólisis del ATP en el NBD (Payen *et al.*, 2003). Además de la característica atípica del Walker B en el NBD1, el motivo C en el NBD2 es inusual (Cole *et al.*, 1992; Grant *et al.*, 1997; Payen *et al.*, 2005). El motivo C de las proteínas ABCC se ajusta al canon con el núcleo conservado LSGGQ. Sin embargo, en el NBD2 de MRP1, CFTR y SUR es LSVGQ, LSHGH y FSQGQ respectivamente (Riordan *et al.*, 1989; Cole *et al.*, 1992; Aguilar-Bryan *et al.*, 1995). El motivo C más extendido normalmente comprende residuos de Arg (R) y Ser (S) muy conservados en las posiciones 8 y 10 en relación al inicio del núcleo. Aunque estos residuos están presentes en el motivo C del NBD1, la Arg (R) es sustituida por Leu (L) y la Ser (S) por Cys (C) en el NBD2 de la mayoría de las proteínas ABCC (Payen *et al.*, 2003, 2005). En P-gp el residuo de Ser (S) es necesario para la hidrólisis (Loo *et al.*, 2002; Tomblin *et al.*, 2004). La mutación del residuo de glicina (Gly, G) en el motivo C no afecta a la unión a ATP, sin embargo hay una pérdida en la capacidad de pasar de un estado de alta a baja afinidad en presencia de ATP (Ren *et al.*, 2004; Payen *et al.*, 2005).

La expresión y localización de las proteínas ABCC es muy variable (Figura 16 y Tabla 2). MRP1 (ABCC1) se expresa a nivel de la membrana basolateral de muchos tejidos incluyendo pulmón, intestino, riñón, testículos, cerebro y en menor medida, en el hígado (Flens *et al.*, 1996). MRP2 (ABCC2) presenta una distribución más restringida que MRP1. Se localiza en la membrana apical de células polarizadas, como los hepatocitos, el epitelio del túbulo proximal del riñón y el epitelio intestinal (Schaub *et al.*, 1999; Leslie *et al.*, 2005). MRP3 (ABCC3) también es una proteína basolateral expresada en la glándula suprarrenal, páncreas, vesícula biliar, placenta y con bajos niveles en hígado, riñón y próstata (Kool *et al.*, 1997; Kiuchi *et al.*, 1998; St-Pierre *et al.*, 2000; Scheffer *et al.*, 2002). MRP4 (ABCC4) se expresa con bajos niveles en el hígado, ovario, testículos, glándula suprarrenal, pulmón, intestino y con niveles altos en la próstata (Lee *et al.*, 1998). Su posición puede ser apical en los túbulos proximales del riñón y en las células endoteliales de los capilares del cerebro, pero también, puede localizarse en la membrana basolateral en las células tubuloacinares de la próstata y en el plexo coroideo (Leggas *et al.*, 2004). La expresión de MRP5 (ABCC5) es en la membrana basolateral del músculo esquelético y cardíaco (Kool *et al.*, 1997; Belinsky *et al.*, 1998; Dazert *et al.*, 2003). MRP6 (ABCC6) tiene una localización basolateral y su expresión está restringida al riñón e hígado (Belinsky y Kruh, 1999). CFTR (ABCC7) es un canal iónico de cloro que se localiza en la membrana apical de pulmón y tejido exocrino. El receptor de sulfonilurea SUR1 (ABCC8) se expresa sobre todo en el páncreas, mientras que los niveles más elevados de SUR2 (ABCC9) se dan en el corazón y en el músculo. Las proteínas MRP7 y MRP8 (ABCC10 y ABCC11) se expresan en el hígado (Hopper-Borge *et al.*, 2004). En cuanto a MRP9 (ABCC12) hay cierta incertidumbre en torno a la distribución en los tejidos, aunque se ha detectado en testículo y mama (Bera *et al.*, 2001, 2002; Tammur *et al.*, 2001).

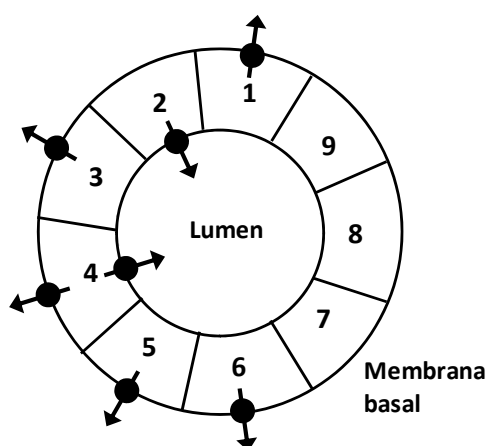


Figura 16. Localización celular de MRP en células epiteliales polarizadas. Se muestra la localización de las MRP en células epiteliales que rodean a un lumen hipotético. MRP1, MRP3, MRP5 y MRP6 se localizan en la membrana basolateral. MRP2 se localiza en la membrana apical. MRP4 puede situarse en la membrana apical o basolateral dependiendo del tejido. La localización de MRP7, MRP8, y MRP9 no está determinada (Modificado de Hopper *et al.*, 2001).

Los sustratos de los transportadores ABCC son en su mayor parte aniones orgánicos. *In vitro*, las proteínas MRP pueden conferir resistencia a fármacos naturales y sus metabolitos conjugados, así como compuestos de platino, antimetabolitos de ácido fólico, análogos de nucleósidos y nucleótidos, oxianiones de arsénico y antimonio, etc. *In vivo*, algunos miembros intervienen en la distribución y eliminación de fármacos y metabolitos contra el cáncer, quizás a través de un cotransporte o mecanismo de simporte con glutatión reducido (GSH). MRP1 y MRP2 tienen una especificidad por el sustrato similar. Ambos transportan conjugados de glutatión y glucoronato, conjugados sulfatados de sales biliares y aniones orgánicos no conjugados de naturaleza anfipática (Keppler *et al.*, 1997; Deeley *et al.*, 2006). MRP3 tiene una menor afinidad por el transporte de conjugados de glutatión que MRP1 y MRP2. La mayor parte de los sustratos de MRP3 son sales biliares monovalentes (Hirohashi *et al.*, 2000). MRP4 y MRP5 transportan análogos de nucleótidos y nucleósidos (Dazert *et al.*, 2003). En cuanto a MRP6, MRP7 y MRP8 se han identificado algunos de sus sustratos. MRP6 y MRP7 puede llevar a cabo el transporte de conjugados de glutatión (Belinsky *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003); y MRP8 transporta nucleótidos al igual que MRP4 y MRP5, conjugados de glutatión, glucoronato y sulfato, y ácidos biliares monoaniónicos (Chen *et al.*, 2005).

La conjugación de ciertas sustancias con el glutatión precede a su transporte a través de la membrana plasmática. En concreto cinco de los doce miembros de esta subfamilia median un cotransporte con el glutatión: MRP1, MRP2, MRP4, MRP5 y CFTR. Las interacciones entre GSH y esta familia son complejas y existen al menos cinco mecanismos diferentes a través de los cuales GSH interacciona con MRP1: (a) transporte de compuestos hidrofóbicos que son enzimáticamente conjugados con GSH; (b) cotransporte de sustratos de MRP1 con GSH; (c) GSH estimula el transporte de ciertos compuestos aunque no se ha observado el cotransporte de GSH; (d) el transporte de GSH es estimulado por ciertos compuestos que no son transportados por MRP1; y (e) transporte de glutatión oxidado (GSSG) por MRP1 (Kruh y Belinsky, 2003; Ballatori *et al.*, 2005) (Figura 17). Diversos estudios han identificado algunos residuos aminoácidos claves en el transporte del GSH y de los conjugados de GSH. Entre ellos la Lys³³² y la His³³⁵ en el segmento transmembrana 6 (Haimeur *et al.*, 2002; Leslie *et al.*, 2004), Pro⁴⁷⁸ en el TM9 (Koike *et al.*, 2004), Phe⁵⁹⁴ en el TM11 (Campbell *et al.*, 2004), Arg¹¹³⁸ en el TM15 (Conseil *et al.*, 2006), dos residuos de Tyr¹¹⁸⁹ y Tyr¹¹⁹⁰ en el segmento citoplasmático que conecta el TM15 con el TM16 (Conseil *et al.*, 2005), y Glu¹²⁰⁴ en el TM16 (Situ *et al.*, 2004).

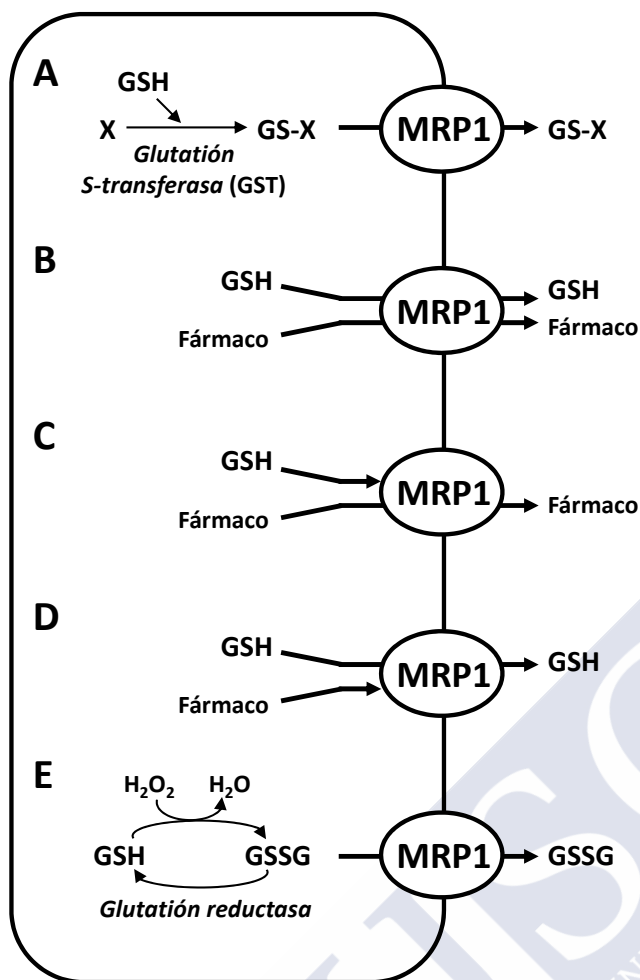


Figura 17. Mecanismo de transporte de GSH mediado por MRP1. (A) Transporte de compuestos hidrofóbicos que son enzimáticamente conjugados con GSH. (B) El transporte de ciertos sustratos de MRP1 requiere un cotransporte con GSH. (C) GSH estimula el transporte de ciertos compuestos aunque no se ha observado el cotransporte de GSH. (D) El transporte de GSH es estimulado por ciertos compuestos que no son transportados por MRP1. (E) Transporte de glutatión oxidado (GSSG) por MRP1. GST: Glutación S-transferasa (Modificado de Kruh y Belinsky, 2003).

Estudios de mutagénesis *in vitro* señalan que mutaciones en un aminoácido pueden alterar la especificidad por el sustrato, la unión del ATP y la actividad de transporte de la proteína. El reemplazo del residuo de Glu¹⁰⁸⁹ por un aminoácido neutro o con carga positiva reduce o elimina completamente la resistencia a la antraciclina en la MRP1 sin influir en el transporte (Zhang *et al.*, 2001). La sustitución de los residuos aromáticos (Trp⁶⁵³ en el NBD1 y Tyr¹³⁰² en el NBD2) por un residuo polar de cisteína (Cys, C) hace que la afinidad por ATP se vea disminuida aunque el transporte de sustratos no se ve alterado (Zhao y Chang, 2004). Además, la mutación del residuo Asn⁵⁹⁷ por Ala (A) cerca del segmento transmembrana 11 aumenta la resistencia frente a varios fármacos, mientras que la sustitución en el aminoácido Ser⁶⁰⁵ por Ala (A) disminuye la resistencia (Zhang *et al.*, 2004). Otras mutaciones están relacionadas con la alteración de la disposición del fármaco, como es caso del residuo de Cys⁴³, que cuando es substituido por Ser (S) interrumpe el tráfico en la membrana plasmática y reduce la resistencia a varios fármacos (Ito *et al.*, 2001a; Leslie *et al.*, 2003). En la proteína MRP2 también se han estudiado los efectos que conlleva la sustitución de un residuo aminoacídico. La mayoría de los sustratos de la proteína MRP2 presentan carga

negativa por lo que los aminoácidos cargados, en concreto, los aminoácidos con carga positiva de los TMD, pueden desempeñar un papel importante en el reconocimiento/transporte de los sustratos. La sustitución de ciertos residuos como Lys²⁴ en el TM6, Lys⁴⁸³ en el TM9, Arg¹²¹⁰ en el TM16 y Arg¹²⁵⁷ en el TM17 por Ala (A) disminuye el transporte de conjugados de glutatión (Ryu *et al.*, 2000). Otras sustituciones, por el contrario aumentan el transporte de conjugados de glutatión, es el caso de los residuos de Ser⁷⁸⁹ y Ala¹⁴⁵⁰ (Hirouchi *et al.*, 2004).

En el presente capítulo se identificarán y caracterizarán genes de la subfamilia de transportadores ABCC en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*.

3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

3.2.1.- Obtención de los animales.

Los mejillones (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) se recogieron del medio natural de bateas situados en la ría de Muros-Noia en noviembre de 2006 y de la ría de Ares-Betanzos en junio de 2007. Todas las muestras fueron proporcionadas por el INTECMAR (Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño, Xunta de Galicia). De cada mejillón se extrajeron los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto. Tras la disección, las muestras fueron almacenadas en *RNAlater*[®] (Ambion, ref. 7024) a -20°C según las instrucciones del fabricante.

3.2.2.- Extracción de RNA y transcripción inversa.

En el proceso de clonación del cDNA del gen *mrp1* se empleó tejido de branquia, en el caso del cDNA del gen *mrp2* fue tejido de glándula digestiva.

En la extracción de RNA se utilizaron aproximadamente 50 mg de muestra. En el caso de la glándula digestiva la extracción de RNA se realizó con el kit comercial *RNAqueous*[®] (Ambion, ref. AM1912) según las instrucciones del fabricante. En branquia, el tejido fue homogenizado en *TriReagent*[™] (Sigma, ref. T9424) empleando la técnica descrita por Chomczynski y Sacchi (1987). Todas las muestras se sometieron a una precipitación con cloruro de litio para eliminar el DNA, ya que el DNA no precipita en esta concentración de la sal de litio, mientras que el RNA sí. Una vez resuspendido el precipitado de RNA en 60 µL de *RNase-free* H₂O (Macherey-Nagel) se mezcló con medio volumen de la solución de cloruro de litio 7,5 M y se dejó incubar a -20°C toda la noche. A la mezcla se le añadió 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó

durante 15 min a 4°C, la fase acuosa se descartó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. El RNA obtenido se resuspendió en 30 µL de una solución libre de RNasa, *RNA Storage Solution* (Ambion, ref. AM7001) que minimiza la hidrólisis de RNA gracias a su bajo pH y a la acción del citrato de sodio como agente quelante.

Las muestras de RNA se trataron con DNasa empleando el kit comercial *Turbo DNA-free*TM (Ambion, ref. AM1907) utilizando 2U de enzima *DNase* (1 µL) y 0,1 volúmenes de tampón en función del volumen final, la mezcla se dejó incubar a 37°C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo se añadió el reactivo de inactivación de la enzima en la misma proporción que el tampón, se incubó durante 2 min a temperatura ambiente y se agitó la mezcla varias veces para favorecer la reacción. El reactivo de inactivación se eliminó mediante centrifugación a 10.000 g durante 1,5 min, recuperando el sobrenadante. La concentración de RNA se estimó por espectrofotometría UV (ND-1000 de NanoDrop) que emplea la ecuación:

$$\text{Concentración del RNA } (\mu\text{g/mL}) = \text{Absorbancia a } 260 \text{ nm} \times 40$$

Para el RNA existe la relación 1 unidad de densidad óptica OD₂₆₀ = 40 µg.

La transcripción inversa de las muestras de glándula digestiva y branquia se llevó a cabo con *SuperScript*[®] *III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, ref. 18080-051). En la transcripción inversa se emplearon 2 µg de RNA total (Tabla 3).

Tabla 3. Componentes y concentración final de los reactivos empleados en la transcripción inversa en los genes *mrp1* y *mrp2* en *Mytilus galloprovincialis*.

Componente	Volumen (µL)	Concentración final
RNA total (2 µg)	x µL	
Random hexamers	1 µL	
dNTPs Mix	1 µL	10 mM de cada dNTP
DEPC Water	hasta 10 µL	
↓ Incubar a 65°C durante 5 min, enfriar en hielo		
10X RT Buffer	2 µL	
Mg Cl ₂	4 µL (25 mM)	5 mM
Ditiotreitol (DTT)	2 µL (0,1M)	
RNase OUT TM	1 µL (40U)	
SuperScript TM III RT	1 µL (200U)	
↓ Incubar a: 25°C durante 10 min, 50°C durante 50 min, 85°C durante 5 min		
RNase H	1 µL (2U)	
↓ Incubar a 37°C durante 20 min		

3.2.3.- Amplificación del fragmento inicial de los genes *mrp* mediante PCR.

Se realizaron PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa) con las muestras de cDNA obtenidas en el proceso de transcripción inversa. Los cebadores empleados en este estudio son los utilizados por Luedeking *et al.* (2005) en el mejillón *Mytilus edulis* (Tabla 4).

Tabla 4. Relación de cebadores utilizados en la PCR para obtener el fragmento inicial en el estudio de los genes *mrp1* y *mrp2* en *Mytilus galloprovincialis*.

Cebador	Finalidad	Orientación	Secuencia (5' - 3')	Amplicon (pb)
<i>mrp1</i>				
MR2-F1	RT-PCR amplificación	Sentido	AAAGACGGACTGGATCACCA	296
MR2-R1	RT-PCR amplificación	Antisentido	AAATTGGTCGGTGAGTCGAA	
<i>mrp2</i>				
MRP King F	RT-PCR amplificación	Sentido	GGTGGCGGTTGAAAGAGTAA	250
MRP King R	RT-PCR amplificación	Antisentido	CCGAAATATAGCTTGGGACAA	

La PCR para el gen *mrp1* se llevó a cabo en un volumen de 50 µL que contenía 2 µL de cDNA de branquia (1,5 µg), 1 µL de cada cebador a una concentración de 10 µM, 1 µL de dNTPs mix 10 mM de cada dNTP, 5 µL de 10X *HotMasterTM Taq Buffer* y 1U *HotMaster Taq DNA Polymerase* (2 µL) (Eppendorf, ref. 0032002.676). El programa utilizado fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 95°C, 2 min; 30 ciclos x (95°C, 1 min; 58°C, 1 min; 70°C, 1 min) y un paso de extensión final de 70°C, 2 min.

Para el gen *mrp2* la reacción de PCR que se llevó a cabo fue la siguiente: 2 µL de cDNA de glándula digestiva (0,9 ng), 1 µL de cada cebador a una concentración de 10 µM, 1 µL de dNTPs mix 10 mM de cada dNTP, 5 µL de 10X *PCR Buffer*, 3,5 µL de MgCl₂ 50 mM (a una concentración final de 3,5 mM), 1U *Platinum[®] Taq DNA Polymerase* (0,2 µL) (Invitrogen, ref. 10966-026) para un volumen final de 50 µL. El programa utilizado fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C, 2 min; 40 ciclos x (94°C, 30 s; 58°C, 30 s; 72°C, 1 min) y un paso de extensión final de 72°C, 4 min.

Los tamaños esperados para los productos amplificados en ambas reacciones de PCR fueron de 296 pares de bases (pb) para el gen *mrp1* y 250 pb para el gen *mrp2*. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa D1 (Pronadisa, ref. 8008) al 2% marcado con bromuro de etidio en concentración 0,5 µg/mL.

3.2.4.- Amplificación de los extremos 5' y 3' de cada cDNA.

La técnica de la amplificación de los extremos 5' y 3' de cDNA (RACE), utilizando el kit *SMARTer RACE cDNA Amplification* (Clontech, ref. 634923), se realizó sobre los transcritos de los genes *mrp1* y *mrp2* para completar la pauta abierta de lectura de ambos genes. La técnica se basa en incluir en la síntesis de la cadena simple de cDNA una secuencia conocida (oligo SMARTer) que hibrida con unos cebadores universales que se utilizan en la amplificación por PCR de la secuencia interna.

El procedimiento es diferente para crear el cDNA que amplifica en sentido 5' (cDNA 5') y el que amplifica en sentido 3' (cDNA 3'). En la síntesis de cDNA 5' se añade a la reacción además del oligo dT (5'-CDS Primer A), que contiene en su extremo 3' dos posiciones nucleotídicas degeneradas, el oligo SMARTer II A con una cola poli-X (secuencia no revelada) en su extremo 3'. Tras la incubación de los oligos con el RNA se inicia el proceso de transcripción inversa. Cuando la enzima alcanza el extremo 5' del RNA añade residuos complementarios que son reconocidos por la cola poli-X del SMARTer II A oligo que sirve de molde para completar la síntesis de la cadena simple de cDNA 5' incluyendo en el extremo la secuencia complementaria al SMARTer II A oligo (Figura 18). En la síntesis del cDNA 3' se añade al RNA un oligo dT (3'-CDS Primer A) modificado que lleva incluido en el extremo 5' la secuencia del SMARTer oligo. Durante la transcripción la secuencia SMARTer queda incorporada en el extremo 3' en la primera hebra de cDNA (Figura 19).

La amplificación de las secuencias se realiza mediante PCR, el programa usado consistió en una desnaturalización inicial a 94°C, 2 min y a continuación 40 ciclos a 94°C, 5 s; 65° ó 60°C (dependiendo de los cebadores utilizados), 10 s; 72°C, 2 min, terminando con un paso de extensión final a 72°C durante 4 min. En las reacciones de PCR se utilizan cebadores diseñados en los fragmentos de secuencia conocida de ambos genes (*mrp1* y *mrp2*) que amplificaran hacia el extremo 5' ó 3' y la mezcla de cebadores universales que reconoce la secuencia SMARTer incorporada en la secuencia de cDNA. Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 5 y se diseñaron utilizando el programa OligoAnalyzer 3.1
(<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Los productos obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa marcado con bromuro de etidio.

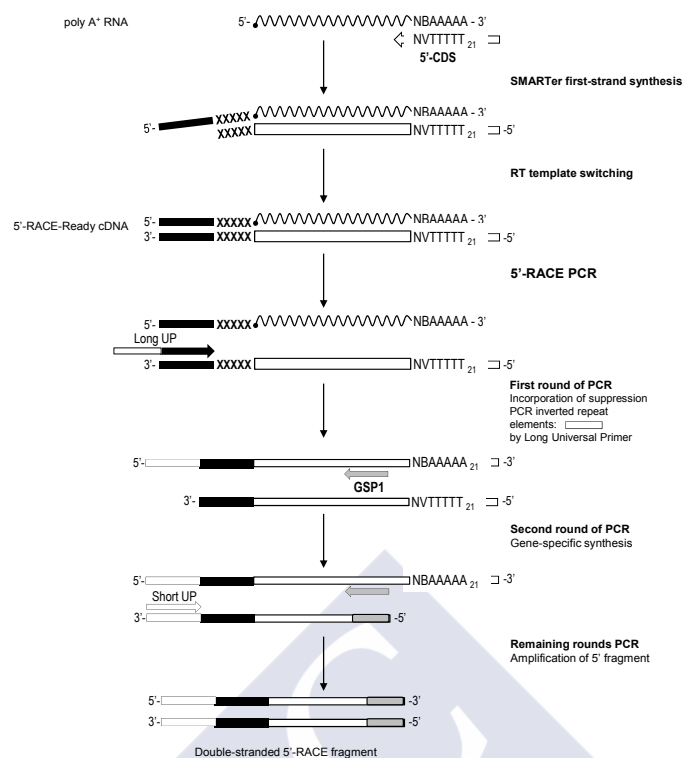


Figura 18. Diagrama detallado de la síntesis de cDNA 5' empleando el kit *SMARTer RACE cDNA Amplification* (Clontech).

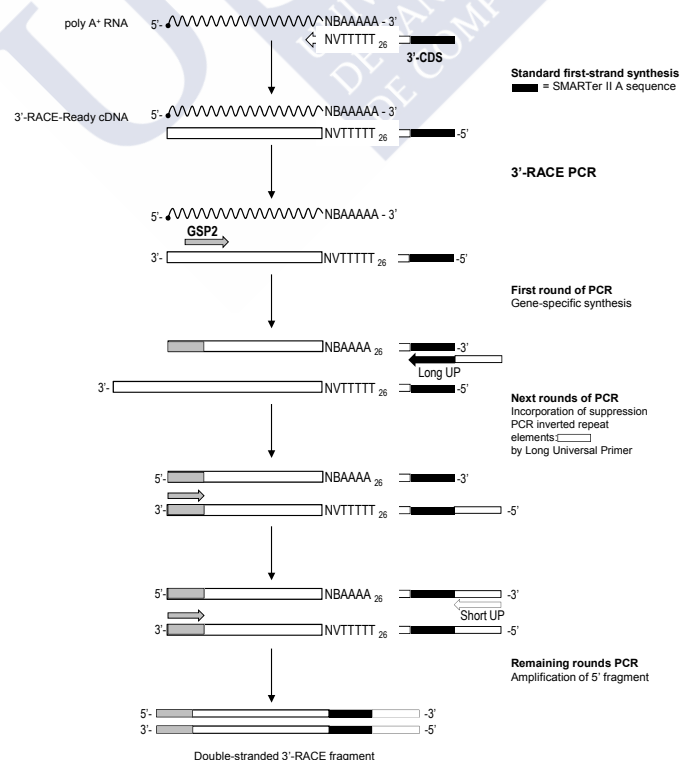


Figura 19. Diagrama detallado de la síntesis de cDNA 3' empleando el kit *SMARTer RACE cDNA Amplification* (Clontech).

En el caso del gen *mrp1*, una zona de aproximadamente 2,3 kilobases (kb) en la que se encontró dificultad para obtenerla mediante amplificación del extremo 5' del cDNA se consiguió empleando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cebadores específicos utilizados se diseñaron a partir de la secuencia ABCC de *Mytilus californianus* (Luckenbach *et al.*, 2008) (Tabla 5). Las dos reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 μ L, conteniendo 1-2 μ L de cDNA, 1 μ L de cada cebador a una concentración de 10 μ M, 1 μ L de dNTPs mix 10 mM de cada dNTP, 5 μ L de 10X *PCR Buffer*, 3,5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM (a una concentración final de 3,5 mM), 1U *Platinum[®]Taq DNA Polymerase* (0,2 μ L) (Invitrogen, ref. 10966-026). Tras optimizar las condiciones de la reacción, el programa consistió en 45 ciclos de: 30 segundos a 94°C (desnaturalización), 30 segundos a 63,7°C para el fragmento cercano al extremo 3' y 60,2°C para el fragmento cercano al extremo 5' (hibridación) y 2 minutos a 72°C (extensión). Los resultados de dichas amplificaciones fueron observados en geles de agarosa marcados con bromuro de etidio.

3.2.5.- Ligación, clonación y secuenciación.

Los productos obtenidos de las reacciones de RT-PCR y RACE-PCR se ligaron en el vector *pGEM[®]-T Easy* (Promega) (Figura 20) utilizando el kit de clonación *pGEM[®]-T Easy Vector System* (Promega, ref. A1380). La ligación se realizó durante toda la noche a 4°C y transcurrido ese tiempo, se transformaron células competentes de *Escherichia coli* de la cepa JM109 tras aumentar la permeabilidad de la membrana mediante choque térmico a 42°C. Las bacterias competentes se crecieron en medio líquido SOC con agitación. Transcurridas dos horas, se realizaron los cultivos en placas de medio Luria-Bertani (LB) suplementadas con ampicilina (Sigma, ref. A9518), X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido, Roche ref. 10745740001) e IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido, Roche ref. 11411446001). Este medio selectivo permite una doble selección de las colonias recombinantes. En primer lugar crecen en un medio en presencia de ampicilina gracias a la resistencia que les concede el gen *Amp^r* portado por el vector. Una segunda selección se basa en el color de las colonias que pueden ser blancas o azules. El vector *pGEM[®]-T Easy* porta el gen *LacZ* y la ligación de los insertos se produce a este nivel del vector. Las colonias azules corresponden a células transformadas con el vector que llevan el gen de la β -galactosidasa funcional que metaboliza los sustratos X-Gal e IPTG dando lugar a un precipitado de color azul. Las colonias blancas corresponden a las células transformadas con el vector que lleva el gen de la β -galactosidasa no funcional por la inserción del fragmento de DNA dentro del mismo. De tal forma que si hay un inserto en el vector se

interrumpe la transcripción del gen que codifica la enzima y por tanto no hay cambio de color en la colonia (Figura 21).

Tabla 5. Cebadores utilizados en la amplificación de los extremos 5' y 3' para el estudio de los genes *mrp1* y *mrp2* en *Mytilus galloprovincialis*.

Nombre cebador	Finalidad	Orientación	Secuencia (5' - 3')	Núm. acceso	Amplicon (pb)
<i>mrp1</i>					
MR2-F2	3' RACE PCR		GATGAGGCAACCGCTGCTGTTG		344
MRP2 DGF	5' RACE PCR		GCITAYGTICICARCARGCNTGG		2.223
MRPPmAf	RT-PCR amplificación	Sentido	CGGAGAAGACCTGGACAAGAG		
MRPPmAr	RT-PCR amplificación	Antisentido	ATCGACGTGCTGATTTCAGTC		1.346
MRPPmBf	RT-PCR amplificación	Sentido	CACGAGACCATACAAACGGAAC		
MRPPmBr	RT-PCR amplificación	Antisentido	CAGCGGTTGCCTCATCAAGTAC		1.380
MRP C F2	RT-PCR amplificación	Sentido	CTGGAAAGGTTACATACTCGCTATCC	EF521415	
MRP Luk R	RT-PCR amplificación	Antisentido	GCACGTGCCAAACTGACTCTTTGCTTTTG	EF521415	1.251
MRP D F1	RT-PCR amplificación	Sentido	CGATGGATAACAGTCTTTCCGTATG	EF521415	
MRP D R1	RT-PCR amplificación	Antisentido	GCTGCATTAGTGAGTCTCAGAGTC	EF521415	1.171
MRP D R2	RT-PCR amplificación	Antisentido	GGATAGCGAGTATGTAACCTTTCCAG	EF521415	1.035
MRP D R4	5' RACE PCR		CATACCGAAAGACTGTTATCCATCG		67
<i>mrp2</i>					
MRPKing Nested3 F	3' RACE PCR		CCACAAGGTACAGAGATGGACTAAGTC		1.158
MRPKing Nested5 R	5' RACE PCR		GCTTCCTGTAATAACAAACCAACAAAGGC		1.176
MRPKing Nested5 R4	5' RACE PCR		GACGTTTGGAAGTCGCATATCTTCATAAG		917
MRPKing Nested5 R6	5' RACE PCR		GCACAACATTAGTTGGATTGAGGTCCTTG		1.094
MRPKing Nested5 R8	5' RACE PCR		CTAATAAGTACGAGGTCTCACTCTCTGTC		865

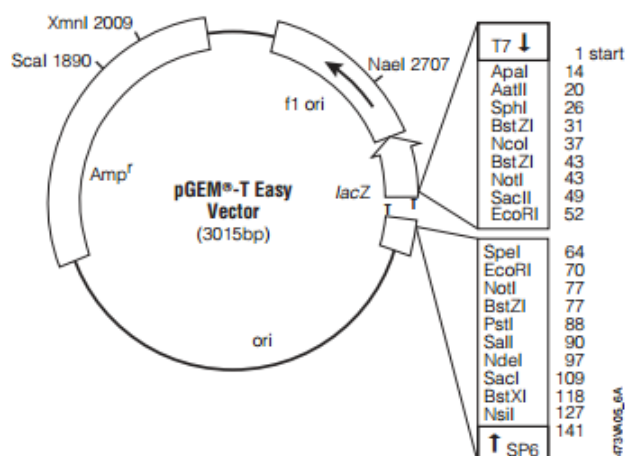


Figura 20. Mapa del Vector *pGEM®-T Easy* (Promega). El vector *pGEM®-T Easy* contiene un origen de replicación (*ori*), el gen de resistencia a la ampicilina (*Amp^r*), el gen *LacZ* y un sitio de multiclonaje con varias dianas de restricción para distintas enzimas.

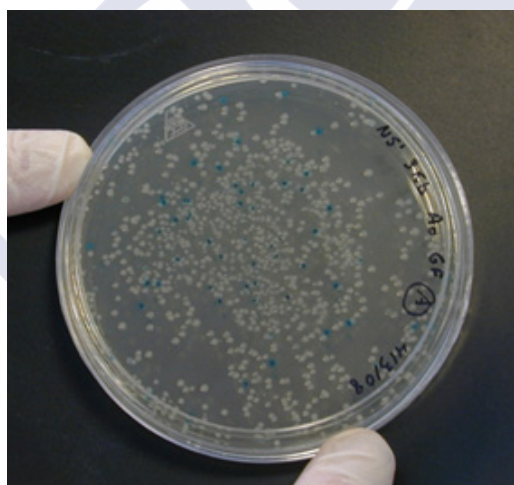


Figura 21. Procedimiento de selección de colonias recombinantes que portan el inserto dentro del vector *pGEM®-T Easy* (Promega).

Las colonias que en principio contienen el inserto se aíslan y se crecen en medio LB líquido/ampicilina durante toda la noche a 37°C con agitación. Una vez comprobado el crecimiento (presencia de turbidez en el tubo) se procede a aislar el DNA plasmídico utilizando el kit *GenElute™ Plasmid Miniprep* (Sigma, ref. PLN350). Este método se basa en someter el cultivo de *E. coli* recombinante a una lisis alcalina-SDS seguida por la adsorción del DNA sobre sílice en presencia de sales. Los contaminantes son eliminados posteriormente en un paso de lavado. Finalmente, el DNA se eluye en agua libre de RNasa.

La presencia del inserto en los clones se detectó por PCR utilizando la pareja de cebadores M13F: GTTTTCCCAGTCACGAC y M13R: GTCATAGCTGTTTCCTG. Esta PCR específica se basa en que a ambos lados del lugar donde se inserta el fragmento de interés el vector contiene la secuencia del Fago λ que coincide con los cebadores M13. Una vez identificados los clones positivos que contienen los fragmentos, los productos se preparan para la secuenciación con los cebadores M13F y M13R por el servicio de secuenciación Secugen del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid) en un secuenciador utilizando el kit *ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystem).

3.2.6.- Análisis de las secuencias.

Los cromatogramas de las secuencias nucleotídicas obtenidas se visualizaron utilizando los programas FinchTV *version 1.4* (<http://www.geospiza.com>) y BioEdit *Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3* (Hall, 1999). Las secuencias finales, una vez se les ha eliminado los extremos del vector, se envían al programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>) para localizar los marcos de lectura abierto (ORF). Localizado el ORF correcto, la secuencia proteica obtenida se compara con otras secuencias de las bases de datos EMBL-EBI (*European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute*) mediante el programa WU-blastp (Matriz Blossum62 y demás parámetros por defecto) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/wublast/>) para verificar su similitud con las secuencias de la base de datos.

Las secuencias parciales de DNA fueron editadas y ensambladas en el programa BioEdit con el programa CAP-*Contig Assembly Program* (Huang, 1992). El programa *Conserved Domain Database CDD* del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>; Marchler-Bauer *et al.*, 2011) se empleó para determinar la existencia de patrones o motivos conservados en la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas. La búsqueda de dominios transmembrana se realizó con el programa Polyphobius (<http://phobius.sbc.su.se/poly.html>; Käll *et al.*, 2005) a partir de la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas. Para crear los alineamientos se usó el programa Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>; Larkin *et al.*, 2007) del EBI. Después de la alineación de las secuencias proteicas se evaluó el porcentaje de conservación de los aminoácidos con el programa GeneDoc *version 2.7* (Nicholas *et al.*, 1997) entre múltiples proteínas. Los análisis filogenéticos se realizaron con las secuencias aminoacídicas utilizando el método de máxima verosimilitud en el programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) calculados en base a un valor de *Bootstrap* de 2.000 repeticiones.

3.3.- RESULTADOS.

3.3.1.- Clonación de los cDNA que codifican para proteínas de la subfamilia ABCC y caracterización de dichas proteínas.

A partir de las secuencias generadas en las reacciones de PCR y amplificación de extremos 3' y 5' se obtuvieron dos secuencias completas que codifican para dos proteínas transportadoras ABC en los tejidos de la glándula digestiva y branquia de *M. galloprovincialis*.

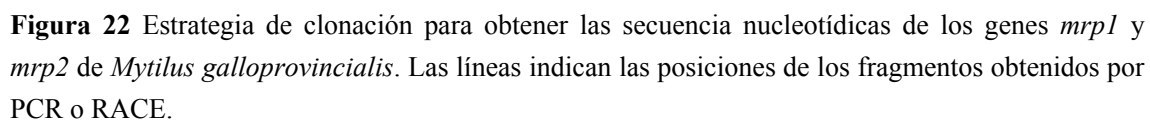
La estrategia seguida para obtener la secuencia completa de los genes *mrp1* y *mrp2* se detalla en la Figura 22 así como las secuencias para cada fragmento pueden examinarse en las Figuras A1 y A2 del Anexo. La secuencia completa del gen *mrp1* se obtuvo a partir de seis fragmentos de PCR, un fragmento amplificado en sentido 3' (3' RACE) y dos en sentido 5' (5' RACE). En el primer fragmento por PCR se emplearon los cebadores MR2-F1/MR2-R1 amplificando un fragmento de 296 pb a partir de la secuenciación de seis clones. Para completar la secuencia en sentido 3' se realizó una 3' RACE con el cebador MR2-F2 obteniendo un fragmento de 344 pb que permitió llegar a la zona 3' no traducida, secuenciando 5 clones. En sentido 5' se realizó primeramente una 5' RACE consiguiendo un fragmento de 2.223 pb con el cebador MRP2 DGF (a partir de la secuenciación de 5 clones) que a su vez se confirmó con dos PCR utilizando los cebadores MRPPmAf/MRPPmAr y MRPPmBf/MRPPmBr amplificando dos fragmentos de 1.346 pb y 1.380 pb respectivamente (obtenidos de secuenciar 5 clones para la primera pareja de cebadores y de 10 clones para la segunda pareja de cebadores). La secuencia en sentido 5' avanzó con tres amplificaciones por PCR obteniendo un fragmento de 1.251 pb con los cebadores MRP C F2/MRP Luk R (a partir de 10 clones), un fragmento de 1.171 pb con los cebadores MRP D F1/MRP D R1 (desde la secuenciación de 5 clones) y un fragmento de 1.035 pb con los cebadores MRP D F1/MRP D R2 (procedentes de secuenciar 7 clones). La secuencia se completó con una 5' RACE con el cebador MRP D R4 obteniendo un fragmento de 67 pb que alcanzó la zona 5' no traducida, a partir de 4 clones.

Por su parte la secuencia completa del gen *mrp2* se consiguió realizando una PCR para obtener el fragmento inicial de 250 pb utilizando los cebadores MRP King F/MRP King R, secuenciando 7 clones. En sentido 3' la secuencia se completó con una única 3' RACE que amplificó un fragmento de 1.158 pb empleando el cebador MRP King Nested3 F y secuenciando 6 clones. La secuencia en sentido 5' se completó con cuatro amplificaciones por 5' RACE. El primer fragmento (1.176 pb) se obtuvo con el cebador MRP King Nested5 R (a partir de 7 clones), el siguiente fragmento de 917 pb

se consiguió con el cebador MRP King Nested5 R4 (desde la secuenciación de 5 clones), el tercer fragmento de 1.094 pb se amplificó con el cebador MRP King Nested5 R6 (para el cual se secuenciaron 10 clones) y un último fragmento que alcanzó a la zona 5' no traducida de 865 pb con el cebador MRP King Nested5 R8, a partir de la secuenciación de 17 clones.

La secuencia completa del cDNA del gen *mrp1* de *M. galloprovincialis* está compuesta por 4.648 pb y codifica para una proteína de 1.500 aminoácidos. Esta nueva secuencia se denominó *mrp1* y fue enviada a la base de datos del EMBL *Nucleotide Sequence Database* con el número de acceso FM999810. Las regiones 5' y 3' - no traducidas están formadas por 44 pb y 101 pb respectivamente. El peso molecular deducido de la proteína es de 169,52 kDa, sin tener en cuenta la glucosilación, y el punto isoeléctrico hipotético es de 6,89. Se localizaron los posibles sitios de N-glucosilación indicados por la secuencia Asn-X-Thr/Ser (donde X puede ser cualquier aminoácido excepto la prolina) en la secuencia de la proteína MRP1. Los dos sitios de N-glucosilación se localizaron en las posiciones Asn⁹⁷¹ - Gly⁹⁷² - Thr⁹⁷³ y Asn⁹⁷⁵ - Gly⁹⁷⁶ - Thr⁹⁷⁷, correspondiendo al segmento extracelular del extremo amino del último dominio transmembrana (TMD2). La Figura 23 muestra la secuencia nucleotídica obtenida y la secuencia aminoacídica deducida de la proteína.

La secuencia del cDNA para el gen *mrp2* de *M. galloprovincialis* consta de 5.065 pb que codifica para una proteína de 1.524 aminoácidos. La secuencia se nombró *mrp2* y fue enviada a la base de datos del EMBL *Nucleotide Sequence Database* con el número de acceso HE599221. Las regiones 5' y 3' - no traducidas de esta proteína comprenden 36 pb y 453 pb respectivamente. El peso molecular deducido para la proteína MRP2 es de 173,38 kDa, sin tener en cuenta la glucosilación, y el punto isoeléctrico hipotético es de 7,55. Al igual que la anterior proteína, MRP2 presenta dos posibles sitios de N-glucosilación situados en las posiciones Asn³⁴⁴ - Phe³⁴⁵ - Thr³⁴⁶ y Asn⁹⁹⁰ - Arg⁹⁹¹ - Thr⁹⁹² que se corresponden con el segmento extracelular del extremo amino del dominio transmembrana 1 (TMD1) y del último dominio transmembrana (TMD2) respectivamente (Figura 24).



A

```

3  gaaaaacgatattgaaaaaaccccaaccagacgggacaaaacg[atgg]gataacagtccttgcgtatgcagttcacagttcagtttaatatagat
93  tcagtaacaatagaaaaaggaccatcttttagcagaa[tgacactgtgctgtttgttttagggacacgtctccactttttgtat]tcaaa
S V T I E K G P S L A E W T L V L F V L G T P L H F L Y F K
183  cgcaatttgcagtagctattgttcagtaacaattc[atcttagcaatattcatcacactattagccatactaaagtttatccatgagctg]
R N L S V A I V Q Y K F I L A I F I T L L G I L S L S Y G L
273  agagatattcatgacgttttgattggagaaaagtcctc[gtggtttttatcttcaattatagttgtttgacacgataattgatacac]
E D I H D V L I G E K S P G G F I L S I S I V L T T I L I H
363  gatgaatctcataaaacacagacgaagaaa[agagaaattacagatttttccacataattggaacttttgcagttttggaatttcgtt]
D E S H K T Q T K K K R N Y R F F H I I G L F C S F G I S F
453  gtttttatttttcaaaacgaaaggatactgctgttgattttcagaataactgggaattacaactaacagagtggaaca[caaaactatat]
V F I F Q K R K D T A V D F Q N N W E L Q L T E W T T K L Y
543  t[gtgtattgataagtggtacctgatagaatcagcaatacaggtttta]aaacaggttctgggagcaaacagctcttttgaaaagggtaaa
C V L I S V Y L I E S A I O V L K Q V L G A N Q S S F E K G K
633  gcagacaaaagacgttttcccgaaat[taaggcatctttttgtcacggtcacatggagttgggttaacgcactttttggat]
A D K D V S P E I K A S F L S R L T W S W V T P F V L F G Y
723  agccataatctcgacccgtcagatttatggcccttaaaacctgaacatgtatctactaataatcattcctatttttcgataagtagctgggaa
S H N L E P S D L W P L K P E H V S T N I I P I F D K Y W E
813  gaggagtagagaaaagctacaagagagacaatcccaagaaaagcgaacgattaagacaacaacattactgttgagaaaaagttcag
E E V E K A T R E R Q S Q E K R T I K T T I T V E K K V Q
903  gcaaacctccttctgt[gtgtataagacacttggagcctgtcttctgtctcagctttttacaattattgtatcatcttgcaggttc]
A N L L R C V I R A L G P A L L L S A F Y K L L Y H L A E F
993  acccttccctatgataagactcctaatgtgcagatgcaagagatggaagaaagagatctggaag[gattacatactccttctatg]
T F P Y M I R L L I G I A R D G K E E I W K G Y I L A I L M
1083  ttttctgtctcaatattcaaatcagttgttttgaattatcatattgaatgaacacaagaagcaggagagtaactgggtgagctcttact
F S V S I F K S V V L N I H I N E T Q E A G R S N W V A L T
1173  gctgccattttataaaagactctgagactcactaatgcagctaaagcagattctactgtaggcgagatcatcaactgtatgtctgtgat
A A I Y K K T L R L T N A A K Q D S T V G E I I N L M S V D
1263  gctgaaaagatagaaaattgtatg[ggagtgatgaatgaatggcgtctctgttatttttcaattcttttctgtgga]
A E K I G N C M W S V N E V W A V P L L F S I S F Y F L W Q
1353  acottaggaccc[cagctctgttggcttataattatactatttggtagcagtaattttgtgtgtaggagaaatcaaaacatttg]
T L G P S V L V G L I I L L L V P V N F V L M R K S K H L
1443  caattggagagcatgaatttaaaagacgcaagaataaaaaagatgaatgaagtcttaaatggaattaaaggttttaagatgtatgcatgg
Q L E S M N L K D A R I K K M N E V L N G I K V L K M Y A W
1533  gaggaaatgttttgagaagcgaatttttagaattcgagacaaagaactacatactagcaggacgaaaaggaattcaaaattggaatgat
E E C F E K R I L E I R D K E L H I L A G R K G I O N W M H
1623  gtatattggcgaacgacgcttttatgatactttt[gtgtaccttgggaacgtacgtgtta]atggatgccaataatgtcatgtcagcagaa
V I W A T T P F M I S L C T F G T Y V L M D A N N V M S A E
1713  aaggtgttttatctctatcactgttcaataatacttcaatattcactacatcttttaccacacgtcatcaactattttatcagacagct
K V F V S L S L F N I L O Y S L H L L P H V I N Y F I Q T A
1803  gtttcttttaaaagaatacaaaacttttgaacaacgaagagctggatataataacaagaataactaataatgagaata
V S L K R I Q N F L N N E E L D T S I I T R N T N S E Y G I
1893  acagttggaagcgaacat[tttatttgggataca]accatggaaccaactttgaaagacattacattcaaaataccagagcactt[gt]
T V E D G T F I W D T T M E P T L K D I T F K I P Q G S L V
1983  gcaatagtg[ggttcggtgggagcagggaagtcc]cggtgtgtgcacacacttgagaaaatggaatcagaacagcgaaagttaattatt
A I V G S V G A G K S S L L S A I L G E M E S E T A K V N I
2073  aaggggttcgattgcat[atgttgcctca]acagccatggataatgaatacaagtttacaacaaaacattcttttcggagaaagacgtggacaag
K G S I A Y V A Q Q P W I M N T S L Q Q N I L F G E D L D K
2163  aggaagtacgaattcattgttagatgcacagctctttagaaaagacttagaagtgttacctggaggggaccaaacagaaattggcgaaaag
R K Y E F I V D A S A L R K D L E V L P G G D C A E I G E K
2253  ggcataaatt[taagtggtggacaaaagcagagagtcag]ttggcccgctgtgtgtatcagaatgctgacat[atatattactggagcattct]
G I N L S G G Q K Q R V S L A R A V Y Q N A D I Y L L D D S
2343  tt[agtgctgttgac]gcacatgttggcaaacacatttttggatgaatcataggctcaaatgggctttttaaagaaagacaa[atactt]
L S A V D A H V G K H I F D E I I G S N G L L K E K T R I L
2433  gttacgctgtgtt[ta]aattacatcaggaaagtcgacatcatcataacaatgggtgagtcggcaatcgagaaaataggatctttgatgaa
V T H G L N Y I R K V D I I T I M V D G R I G E I G S F D E
2523  ctactgaaacacgatggaccttttgcaggattcatgaaaattatttggcgaagaactgagtagtgatgaacaaaacatagtttcg
L T E H D G P F A G F M K N Y L A E E L S T D D E Q N I V S
2613  tacagaaaattagaagaaaatcaaccactgacgagacaattatccatagtagacacattcagatattgtacacagattaaagtgaattca
Y R K L E G K S T T D E T I I H S T H S D I V H S I S D N S
2703  aatataccaatagccagacagatgtcacgacagcgtcatgtgacagcgagtcacggaagttttatcataataacattagtcaggag
N I P I A R Q M S R Q T S C E S E S E V L S H N T V L Q E
2793  gagaatacagagtcaggatcggtaaaattaaacgtgattatgacctatgaaga[gctgttggcgttaagattgtaaatgttatattaaca]
E N T E S G S V K L N V I M T Y V R A V G V K I V I V I L T
2883  atgagtattgttcatgaagttg[ccgagatgtat]ttagatgtgtggcttagtaaatggacacgagaccatacaaacggaaacagttaatgga
M S M V H E V A E M Y L D V W L S K W T R D H T N G T V N G
2973  actcaagaacaggag[acttgaatttgaactataggaacttttagaggtgtgtcaatctttatcaggaacacttttacttat]
T Q R N R R L G I Y G A I G L F R G V S I F I T E T F V T Y

```

Figura 23 Secuencia nucleotídica de *mrp1* (A) y secuencia aminoacídica deducida de la proteína resultante (A y B) de *Mytilus galloprovincialis*. Los codones de inicio y fin están enmarcados en un rectángulo. Los dominios transmembrana (TMD0, TMD1 y TMD2) se indica en negrita y las hélices transmembrana aparecen subrayadas. Los dominios de unión al nucleótido (NBD) que contienen los motivos conservados: *A-loop*, *Walker A/P-loop*, *Q-loop*, *Motivo C*, *Walker B*, *D-loop*, *H-loop/Switch region* aparecen marcados. Los sitios de N-glucosilación están sombreados en gris. La señal de poliadenilación aparece subrayada en rojo.

3063 ggactgataaaggcaactagaaaactccataaaaatttggttacgtaacattctgagatcaccaatgagtttttcgataccacacggta
G L I K A T R K L H K N L L R N I L R S P M S F F D T T P V
3153 ggcaggattgttaaactcggttctcgaaggatagaaaaccatagacgacgaactgatctaccagtttaaaagacgtggtcatatggttgcga
G R I V N R F S K D I E T I D D E L I Y Q F K D V V I C L L
3243 ttagttttgtgataacagtcacatcattagcactgggacacctcagtttattttataatgcttccagtcacggttgtgattttccgctta
L V L C N T V I I S T G T P Q F L F I M L P V T V V Y F A L
3333 cagcgtttgtacgttttcgacatctcgacaattaaggacgatggcatcagcagctcgatccctgtattttcacactttgggaaaccatt
Q R L Y V S T S R Q L R T M A S A A R S P V F S H F G E T I
3423 tctggatgttcgacaactccgggctttcaacaagagaaaaagatttatgactgaatcagcagctcgatttgatgaactcaacacacgtcgt
S G C S T I R A F Q Q E K R F M T E S A R R F D E L N T R R
3513 tctcttgacgatcagttgaaaagtggttacatccgactagacgtttaggaagcattatagtattgtgtgtttgactgactgattgta
S L A R S V E K W L H I R L D W L G S I I V L C V C L L V V
3603 gtaaatgaaggacgatctctcagcaggatagttggtttggttattacgtacgctttgaatgtgactaattgcatacgaatggttggta
V N K D D I S P G I V G L A I T Y A L N V T N C I E W L V K
3693 ttaactcgaatgcagaaacgaatattatatctcttagagagaatcaaagaataactcagaaacacatacagaggctgattggatagtgga
L T T N A E T N I I S L E R I K E Y S E T H T E A D W I V E
3783 aataaaagaccagaacatgattggccaaacgaaggaatgttgaattggacaattatggttgcgtatagggaaaggtcttgaattgatt
N K R P E H D W P N E G N V E M D N Y G V R Y R E G L E L V
3873 ttgaaaagcatctcatgtaaaatagctccatgtgaaaagattggtattggttggcgaacagagagctgggaagtcctcatttaaccatgggc
L K S I S C K I A P C E K I G I V G R T G A G K S S L T M G
3963 ctgttcagaattatagaaaaagctcaaggacggattcttatagatgggatcgacatttctacgataggacttcgatctgagatcaaag
L F R I I E K A Q G R I L I D G I D I S T I G L H D L R S K
4053 attactattataccacagatccagttttgtttctggaacaatgagaatgaactggatccgtttgatgaataactctaacgaagacatt
I T I I P Q D P V L F S G T M R M N L D P F D E Y S N E D I
4143 tggacagccctcaaccatgcacatctgaaagcctttgtgactgtttaaaagacggaactggatcaccattgttctgaaggaggagataac
W T A L N H A H L K A F V I G L K D G L D H H C S E G G D N
4233 ctaagtgttggtcaacgacaattaatctgtcttgaagagccttactgagaagactaaaatttagtacttgatgaggaaccgctgct
L S V G Q R Q L I C L A R A L L R K T K I L V L D E A T A A
4323 gttgatttggaacagatgacittatacagaccaccattagaacagaatttgcagactgcactataactatagctcacagacgaat
V D L E T D D L I Q T T I R T E F A D C T I L T I A H R L N
4413 acaataatggactatactagaattatggtattagattgtgacaaatcaggaattcgactcaccgaccaatttactattagataaagag
T I M D Y T R I M V L D C G Q I R E F D S P T N L L D K K
4503 agtatatattttatggtatgtcaaaagatgccggcttggtgtcttgcagataatggtattaaagtctttgataaataggattttatgtaaaa
S I F Y G M S K D A G L V S *
4593 aatatatttttttcccaataaattcttttgacaaaaa 4648

B

MDNSLSVCSSQFSLIDSVTIEKGPSLAEWTLVLVFLVLTPLHFLYFKRNL SVAIVQYKFILAI FITLLGILSLSYGLRDIHDVL
IGEKSPGGFILSISIVLTTILIHDESHKTQTKKKNRYEFFHIIGLECSFGISFVFIFQKRKDTAVDFQNNWELQLTEWTTKLY
CVLISVYLIESAIOVLQQVLGANQSFEKGKADKDVSP EIKASFLSRLTWSWVTPFVLFGYSHNLEPSDLWPLKPEHVS'NIIP
IFDKYWEEVEKATRE RQSQEKRTIKTTTITVEKKVQANLLRCVIRALGPALLLSAFYKLLYHLAEFTFPYMRILLIGIARDG
KEEIWKGYILAILMFSVSIFKSVVLNIHINETQ EAGRSNNVALTAAYKKTLRLTNAKQDSTVGEIINLMSVDAEKIGNCMW
SVNEVWAVPLFSISIFYLWQTLGFSVLVGLIIILLVPVNFVLMRKSKHLQLESMLNKDARIKKMNEVLNGIKVLKMYAWEE
CFEKRILEIRDKELHILAGRK GIONWMHVIWATTFPMISLCTFGTYVLM DANNVMSAEKVFSLSLENILOYSLHLLPHVINY
FIQTAVSLKRIQNFLNNEELDTSIITRNTNSEYGITVEDGTFIWDTTMEPTLKDITFKIPQGS LVAIVG SVGAGKSSLLSAIL
GEMESETAKVNIGKSIAYVAQQPWIMNTSLQQNILFGEDLDRKRYEFIVDASALRKDLEVLPGGDQTEIGEKGINLSGGQKQR
VSLARAVYQNADYLLDDSLSAVD AHVGKHIFDEIIGSNGLLKEKTRILVTHGLNYIRKVDIIITMVDGRIGEIGSFDELTEH
DGPFGAFMKNYLAELSTDDEQNI VSYRKLEKSTTDETIHSTHSDIVHSISDNSNIPIARQMSRQTSCESESSEVLSHNTL
VQEENTESGSVKLNIVIMTYVR AVGVKIVIVILTMSMVHEVAEMYLDVWLSKWTRDHTNGTVNGTQRNRR LGIYGAIGLFRGVS
IFITETFTVYGLIKATRKHLKNLLRNILRSPMSFFDTTPVGRIVNRFSKDIETIDDELIYQFKD VVICLLLVLCNTVIISTGT
PQFLFIMLPVTVVYFALQRLYVTSRQLRTMASAARS PVFSHFGETISGCSTIRAFQOEKRFMTESARRFDELNTRRS LARSV
EKWLHIRLDWLGSIIIVLCVCLLVVNKDDISP GIVGLAITYALNVTNCIEWLVKLTTNAETNIIISLERIKEYSETHTEADWIV
ENKRPEHDWPNEGNVEMDNYGVRYREGLELVLSISCKIAPCEKIGIVGRTGAGKSSLTMLGFRIIEKAQGRILIDGIDISTI
GLHDLRSKITIPQDPVLFSGTMRMNLDPFDEYSNEDIWTALNHAHLKAFVIGLKDGLDHHHCEGGDNLSVGQRQLICLARAL
LRKTKILLVLEDAATAVDLETDDLIQT TIRTEFADCTILTI AHR LNTIMDYTRIMVLD CGQIREFDSPTNLLLDKKSIFYGMSK
DAGLVS*

Figura 23 (continuación)

A

```

1  gaaacataattttaaacgtgtagagatttgtgttcaatgatagattctgcaacgggaacaccttttgggattcaaatgtgacatgggat
91  ggggattggccagaattcaccgaatgttttcaggacaccattctgggtggtgattacatcagggtggttatggaccaccgacctttttac
G D W P E F T E C F Q D T I L V W I T S G W L W T T A P F Y
181  gttatctatttagcacaaactttctctaccagatgtcagtggaacatggaagacatatcaaaactggtttcttaccgattttttattacaca
V I Y L A Q L S S T R C Q W T W K T Y T K L V L T V L L L A
271  ttacaatcaatggacgttctcttggctgtgaataaactaacaatgattggatgaaagcttcagttattgacacaaatcatcgaaggaatt
L O S M D V V F A V S K L T N D W M K A S V F A P I I E G I
361  actctcatttttgataatgatttatagcgatggaaagacagaaggttttagttacatccgggatactattttatttactggactcttgaat
T L I L I M I Y I A M E R Q K G L V T S G I L F I Y W T L S
451  ttactatccagcattattccattttactcaagattatcaaaaaggaatatgaacaaaactatttcgaattttgttttttttattttatcc
L L S S I I P F Y S K I I K K E Y E T K L F E F V I F Y L S
541  ttactttttaccgattattcaatggattctgaatagcatagcagaaaaccatctgcagcaaaagacatgaaccagacaagagtcttcg
F T F T V I O W I L N S I A E N H L Q Q K D M N P E Q E S
631  tttttgtccagaataacatttagctggatgactagattgatgcaagggtacaagaaacctttaacagaagattctgtgttcggtttta
F L S R I T F S W M T R L M M Q G Y K K P L T E D S V F G L
721  aaacaagagatataagtcagaagcctacagtagattttataacaattgggtcacagaatgtgcttcagcaagacctatgaatgaaca
K Q R D T S Q E A Y S R F Y N N W V T E C A S A S H E Y E T
811  gctaactaccagttaccattacaagaagcagagagtgagacctgtacttattagtaagctctataaaaaacataaaatctcagcagcac
A N H Q Y H L Q E A E S E T S Y L L V K S H K N I K S Q Q H
901  cagaccaaaacatccctgattaaagtctctctagacgtttgtctgatactattttattgccaattttggaagattcttatatgattga
Q T K P S L I K V L C R T F A V Q L F I A N I W K I V Y D V
991  acgttcttattctcaccattttcttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
T L F I S P F L L K M L I D Y T A A S K D P E I S N F T Q E
1081  tggaaagggctactcttttagtggcggcattcttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
W K G Y S L V A A F F V T I L I O S L M F H Q Q S F W S M T
1171  ttgggaatgaggggtcaaatcagcttttgatgtcagctgtgtatcaaaaagcactaagaatgacagagcaggcagaacactctactgtc
L G M R V K S A L M S A V Y Q K A L R M T S E A R Q N S T V
1261  ggagagatagtcacactaattgtctattgatgcacaaatatatacaggactttataagttatttttttttttttttttttttttttttttt
G E I V N L M S I D A Q N I Q D F I S Y F W V L W S S P L Q
1351  agttgttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
S C F S L Y F L Y D T M G H S M W S G I G V L L I L I P L N
1441  ggttttctcatatcttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
G F V I S K I H K L Q A Q Q M R Q K D E R I K L L S E V L N
1531  ggaataaagatttttaagatgtatgcctgggaaatggcattcaagataaagtgttaataattaggaacatggaaactaaactttttt
G I K I L K M Y A W E M A F K D K V L I I R N M E L K I L F
1621  aaagctgctatttataagaatagttatttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
K A A I V R I I F S R A V A P Y F V S L A C T A T Y I F
1711  atgtcatctgatcattacttagatgccaaagaagccttctgtgcccatttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
M S S D H Y L D A K K A F V A I S L F N I L R V A I S F A P
1801  atggcagtcataaaactatcaagcgagtggttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
M A V N K T I K A S V S F H R L N K Y L N S K D L N P T N V
1891  gtgcataactccaaagatgatgcaattgttaatggaagtggaaccttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
V H N T P K D D A I V I E D G T F S W D P D G G K C F R N I
1981  aacattactatacccgagaaaaagtttagttagctgttagtttggtcatgtagggtgtggaatacaagcttgctgtcttcaattttgggat
N I T I P E K K L V A V V G H V G C G K S S L L S S I L G D
2071  atgaccaaaagtcaaggcagtgtagagataaagggttaaatcagttatgtgtcccccagcaagcatggatgacagaatgcaagtggttagac
M T K V K G S V R V K G K I S Y V P Q Q A W I Q N A S V V D
2161  aatattttttttgtgtgaaatggatcagaagaagtataaagcgttatcgatgctgctgcgcctcgcaacagattdatgatattaccac
N I L F G C E M D Q K K Y K D V I D A C A L R T D L D I L P
2251  gcgtctgatcgtagagatttaggagaaaagggtattaatttaagtgaggagccagagaagtagtttagcccgagctgtataccat
A S D R T E L G E K G I N L S G G Q K Q R I S L A R A V Y H
2341  gacacggacactatctctcctcgatgaacccctttagtcaagtagatcttaagtgttggttaaacatatctttgagaagttattgttaaacac
D T D I Y L L D D P L S S V D S N V G K H I F E K V I G N T
2431  ggactattatcggaataagacgcgggttttttggttaacccatggcttaagatggctgccattttgtagacaagattattgttaattgttgatgga
G L L S D K T R V L V T H G L R W L P F V M D K I I V M V D G
2521  tctatatcagaataagaaacttacaagaactcctgtcacatgacgggctttttgcagttttttgaaatgtatatcatagaacagaca
S I S E I G T Y E E L L S H D G A F A Q F L K M Y I I E T A
2611  gaagacgagggacccggaagagagagaaaaataaaactgatatacacaagacttattttctggcgagattgttgataaactatgataga
E D E D D P E E E K I K T D I S Q R L I S G G S G D N Y D R
2701  ttattagaactcaaacagatgatgtaaaacttcttatgaagatctgcaggtccaaacgtctgagaacggaagcgaactaagtcaggaa
L L E T Q T D D V K L L M K I C E S K R L R N G S K L S Q E
2791  agctttgtagaagttcctgtacagaaaaagtaaaactcacaacggacgaacacagaggaagacatgtacgttttaagcatttttataacc
S F V E V P V Q K S K L T T D E T T E E G H V R L S I F I T
2881  tatgcaaaaagccatcggactagttatagtggtgattattctattttgtgtatgccttatcaaatatcatcagttattagcgaattatgg
Y A K A I G L V I V G I I L F V Y A A L Y O I S S V L A N I W
2971  ttaagtcattggacctcgattcggtgtcttaccacagaacacttggaacactgatagccatataatggaagacagaaattattac
L S Q W T S D S L T N R T L G K P D S H T Y M A K N N Y Y

```

Figura 24. Secuencia nucleotídica de *mrp2* (A) y secuencia aminoacídica deducida de la proteína resultante (A y B) de *Mytilus galloprovincialis*. Los codones de inicio y fin están enmarcados en un rectángulo. Los dominios transmembrana (TMD0, TMD1 y TMD2) se indica en negrita y las hélices transmembrana aparecen subrayadas. Los dominios de unión al nucleótido (NBD) que contienen los motivos conservados: *A-loop*, *Walker A/P-loop*, *Q-loop*, *Motivo C*, *Walker B*, *D-loop*, *H-loop/Switch region* aparecen marcados. Los sitios de N-glucosilación están sombreados en gris.

3061 ctccttgcctatggtggaatttgaattgctcaagctgtatttgttctcgtttttattggtatatttatggtcgcgacaaacacagctaca
 3151 L L V Y G G F G I A O A V F V L V F I G I F M V R S I T A T
aagttactacacgaaggcttcttcacagtggtatcaggtcaccatgtcattttttgacaccaactccttttgtagaattgtaga
 3241 K L L H E R L L H S V I R S P M S F F D T T P F G R I V N R
ttttctgcgatacagatacaatagataacgatttaccacactactgttcagaagtgggtggaattggtttttcgaagtgtttcaacactt
F S A D T D T I D N D L P T T V O K W L E C V F R V I S T L
 3331 gtcgtcatatcatcacagcacacctttattttgcgctgtgattgtcccggttggagttgcatacttctttttcagaagattttatgtagcc
V V I S Y S T P L F C A V I V P F G V A Y F F L O R F Y V A
 3421 acttcacgtcagttaaaaagacttcagtcgaagacggttccccaatttacagccatttcagcgaactatctcaggtgccactgtaata
T S R Q L K R L Q S K T R S P I Y S H F S E T I S G A T V I
 3511 cgtgcttattgtgctgaaaaatcattcatcaaaacatcaaatgacagaataaatctaaatcaaagatttcaatatgcaattataagtgct
R A Y C A E K S F I K T S N D R I N L N Q R F Q Y A I I S A
 3601 aatagggtggttgaatccgacttgaattctttggaataataattatattgttctgctgacttggctgtactgtcaagagggaagcata
N R W L G I R L E F F G N I I I C S A A L L A V L S R G S I
 3691 gaaggaacaaatcgtcgaatttctcactacgtttacagactgacacactggaactggtttgttagaatgacaagtgtatctcgaa
E G A I V G L S I S Y A L O M T D N L N W F V R M T S D L E
 3781 acaaatattgtatcggtgaagagtaaggaatacactgattctcctgcagagggccgaactttataatgattataagcttctgtaat
T N V K E Y T D I P A E A E L Y N D Y K L P V N
 3871 acaaccaacaaggcggttatagatttcaacaactactccaaggtacagagatggactaagctcgttttgaataatcacctttaa
T N Q Q G V I E F Q Q Y S T R Y R D G L S L V L K N I T F K
 3961 atagaaccaggagaaaagggttgaattgttgaagaactggtgcaggaagacatcattgtcccaagctatatttcggttaatagaacct
I E P G E K V G I V G R T G A G K T S L S Q A I F R L I E P
 4051 acaaccggaagaataattgttgacggggaagatatacaatgactggtgacctagatctaaagtcaccgttctacotcaagat
T T G R I I V D G E D I S M M G L H D C R S K V T V L P Q D
 4141 ccagtgtatttttgcgaagtctccgcatgaacatagatccaatggaacaccacacagatgatcaaatatggcgagcatagaacatgca
P V L F S G L R M N I D P M E H H T D D Q I W R A L E H A
 4231 catattaaggattttatacaacatttaccttctaaactcgattatgactgtggagaggaggccaaaatctcagcattggacaacgtcag
H I K D F I Q H L P S K L D Y D C G E G G Q N L S I G Q R Q
 4321 cttatatctcttctgtaggtattctcgttaaatcaaaagatactgattagatgaagctactgctgcggttgatatggaaaaggatgca
L I S L A R S I L R K S K I L I L D E A T A A V D M E K D A
 4411 ttaatacaacaaactataagagaggaattttcagaattgtactgtttactattgccatcgccttaatacagttatggactataacaga
L I Q Q T I R E E F S E C T V L T I A H R L N T V M D Y N R
 4501 attatggtactcgacaacggaagataattcagtttgataccccagagaatttgttacgacatcctggtggattgtttatcaacttgca
I M V L D N G K I I Q F D T P E N L L R H P G G L F Y Q L A
 4591 aaggactctggaatcatctaattatcatatgaacccaataacttgatcatgtttacatggatcgatatctaaattgctgggcatataat
K D S G I I
 4681 caacatcttcatataaatttaggatgcaatatccggtttgttaatacaagttctacaaaagattaaaaatgtatagccaaactttcaacca
aatttttgtaccaagaacaatttggtaaacttttaatatgtggaacaatgaaggacttaataatttatcagttgtacatagatta
 4861 tgtaaatcgaaatctataacgtcacttcacgtacgttttaaatttagaaaatctacatactataggacacaagaacaacactgtccaaa
 4951 acataaaagtaacaacatggaagataatcgtttttttctgtcgtacattttgtatagagttccagtggaatctgaaatatccaaat
 5041 ctagaaaatataatcattgtgtt 5065

B

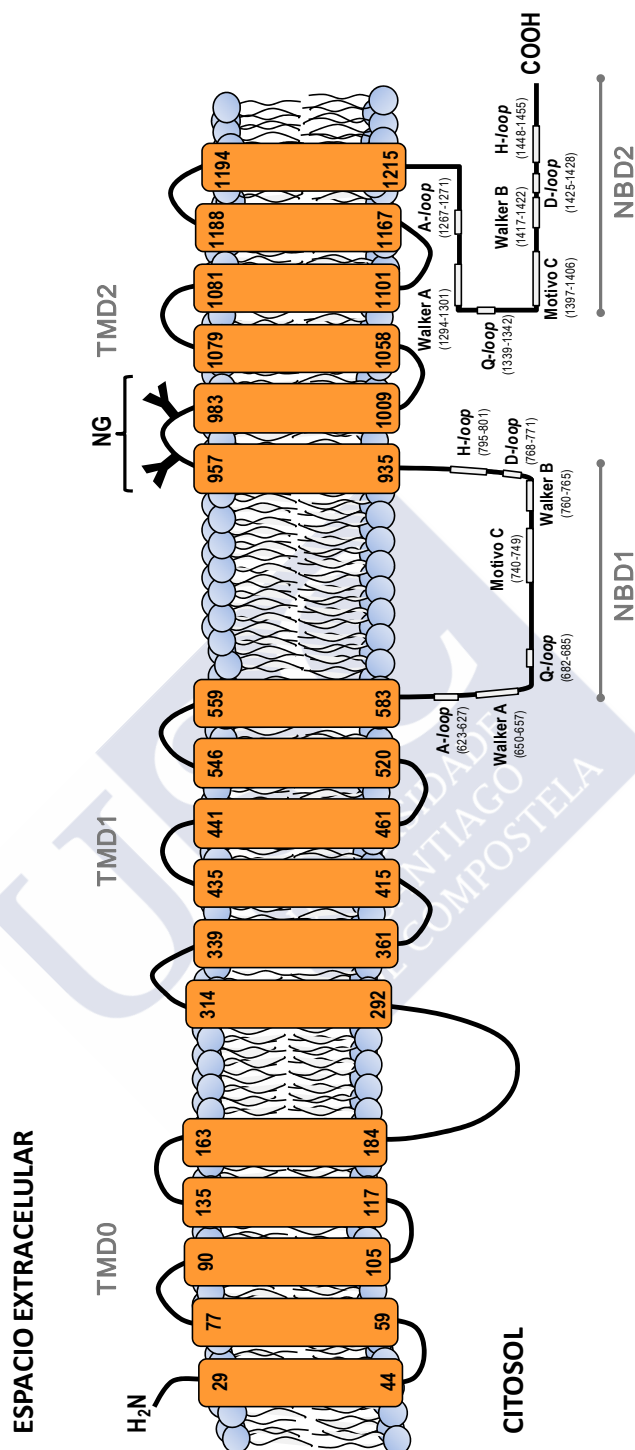
MDRFCNGKPLWDSNLTWDGDWPEFTECFQDTHLVWITSGLWLTAPFYVIYLAQLSSTRCQWTKTYTKLVLTVLLLALQSM
 VVFAVSKLTNDWMKASVFAPIEGITLILIMIYIAMERQKGLVTSGLIFIYWTLSLLSSIIPFYSKI IKKEYETKLFEFVIFY
 LSFTFTVIQWILNSIAENHLQQKDMNPEQESSFLSRITFSWMTRLMQGYKKPLTEDSVFGLKQRDTSQEAYSRYFNWVTEC
 ASASHEYETANHQYHLQEAESYSLLVKSHKNIKSQQHQTKPSLIKVLCRTFAVOLFIANIWKIVYDVTLFISPFLLKMLID
 YTAASKDPEISNFTQEWKGYSLVAFFVTILIQSLMFHQOSFWSMTLGMVRVKSALMSAVYQKALRMTSEARQNSTVGEIVNLM
 SIDAQNIQDFISYFVWLWSSPLOSFLYFLYDTMGHSMWSGIGVLLILIPLNGFVISKIHKLQAQQMRQKDERIKLLSEVLN
 GIKILKMYAWEMAFKDKVLIIRNMELKILFKAAIYRIVIFISRAVAPYFVSLATFATYIFMSSDHYLDAKKAFAISLFLNLR
 VAISFAPMAVNKTIKASVSFHLNKLNSKDLNPTNVVHNTPKDDAIVIEDGTFSWDPDGGKCFRNINITEPKLVAVVGHV
 GCGKSLLSSILGDMTKVKGSVRVKGISYVPOQAWIQNASVDNIFGCEMDQKKYKVIDACALRTDLDPASDRTELGE
 KGINLGGQKQRI SLARAVYHDTDYLLDDPLSSVDNVGKHIFEKVIGNTGLLSDKTRVLVTHGLRWLPFVDKIIVMVDGSI
 SEIGTYEELLSHDGAFAQFLKMYIIETAEDDDPEEEKIKTDISQRLISGGSGDNYDRLLTQTDDVKLLMKICESKRLRNGS
 KLSQESFVEVPVQSKLTTDETTEEGHVRLSIFITYAKAIGLVIVGII LFVYALYOISSVLANIWLSQWTSDSVLNTRNLGKP
 DSHTYMAKNYYLLVYGGFGIAQAVFVLVFIGIFMVRISITATKLLHERLLHSVIRSPMSFFDTPFGRIVNRFSADTDTIDND
 LPTTVOKWLECVFRVISTLVVISYSTPLFCNAVIVPFGVAYFFLQRFYVATSRLKRLQSKTRSPIYSHFSETISGATVIRAYC
 AEKSFIKTSNDRINLNQRFQYAIISANRWLGIRLEFFGNIIICSAALLAVLSRGSIEGAIVGLSISYALOMTDNLNWFVRMTS
 DLETNIVSVERVKEYTDIPAEALYNDYKLPVNTNQGVIEFQYQYSRYRGLSLVLKNITFKIEPGEKVGIVGRTGAGKTS
 SQAIFRLIEPTTGRIIVDGEDISMMGLHDCRSKVTVLQDPVLFSGSLRMNIDPMEHHTDDQIWRALHAHAKDFIQHLPSKL
 DYDCGEGGQNL SIGQRQLISLARSILRKSILLIDEATAAVDMEKDALIQQTIREEFSECTVLTIAHRLNTVMDYNRMVLDN
 GKIIQFDTPENLLRHPGGLFYQLAKDSGII*

Figura 24 (continuación)

En eucariotas, la síntesis de una proteína se inicia con el reconocimiento del codón de iniciación ATG. Este codón suele estar normalmente incluido en la Secuencia consenso de Kozak o 5'-RCCATGG-3' siendo R una purina (A, adenina o G, guanina) (Kozak, 1986, 1987, 1989, 1992, 1999, 2004). Dentro de esta secuencia, existen dos posiciones que determinan la eficiencia de la traducción, una guanina en posición +4 y una purina en posición -3 (preferiblemente una adenina). La traducción por los ribosomas es más eficaz cuando está presente una secuencia de Kozak óptima, es decir, un codón de iniciación óptimo (ATG) en un contexto óptimo (el ATG precedido directamente por RCC y seguido directamente por G). La secuencia de Kozak que rodea el codón de iniciación en el gen *mrp1* muestra todas las características óptimas antes señaladas, una adenina en posición -3 y una guanina en posición +4 (secuencia *mrp1*: AcgATGG). En cuanto al gen *mrp2*, la secuencia que rodea al codón ATG solo contiene una de las dos posiciones críticas la guanina ubicada en la posición +4 mientras que la posición -3 está ocupada por una timina (secuencia *mrp2*: tcgATGG). Aunque el codón de iniciación no se encuentra en el contexto idóneo, en ocasiones los ribosomas reconocen y usan secuencias de iniciación de la traducción no óptimas para iniciar la síntesis de proteínas.

El análisis de las secuencias aminoacídicas de los genes con el programa *Conserved Domain Database CDD* mostró la organización estructural de los transportadores ABC. Ambos genes están compuestos por dos dominios de unión al nucleótido (NBD) y dos dominios transmembrana (TMD) además de un dominio transmembrana adicional (TMD0) que presentan algunos miembros de la subfamilia ABCC. Dentro de cada NBD se localizaron los motivos conservados característicos de todas las proteínas ABC: Walker A (también llamado *P-loop*), Walker B, motivo C y los A-, Q-, D- y H-*loop* (Figuras 23 y 24).

La predicción de la estructura de los dominios transmembrana de las dos proteínas de membrana se llevó a cabo con el servidor Polyphobius. El programa permitió identificar los elementos de su estructura secundaria y su topología, es decir, el número y la orientación de los segmentos que atraviesan la bicapa lipídica. Tanto para la proteína MRP1 como MRP2 el programa predijo 17 segmentos transmembrana (α -hélices) agrupados en tres dominios transmembrana, cinco segmentos (α -hélices) en el TMD0 y 6 segmentos (α -hélices) en cada uno de los TMD1 y TMD2. El extremo amino-terminal se localiza en posición extracelular mientras que el extremo carboxi-terminal es citosólico. Debido al ambiente hidrofóbico dentro de la membrana celular, los segmentos transmembrana son hidrofóbicos separados por segmentos hidrofílicos y aquellos aminoácidos con carga positiva tienen preferencia por la parte citosólica (Figuras 23, 24 y 25).



58

MRP2

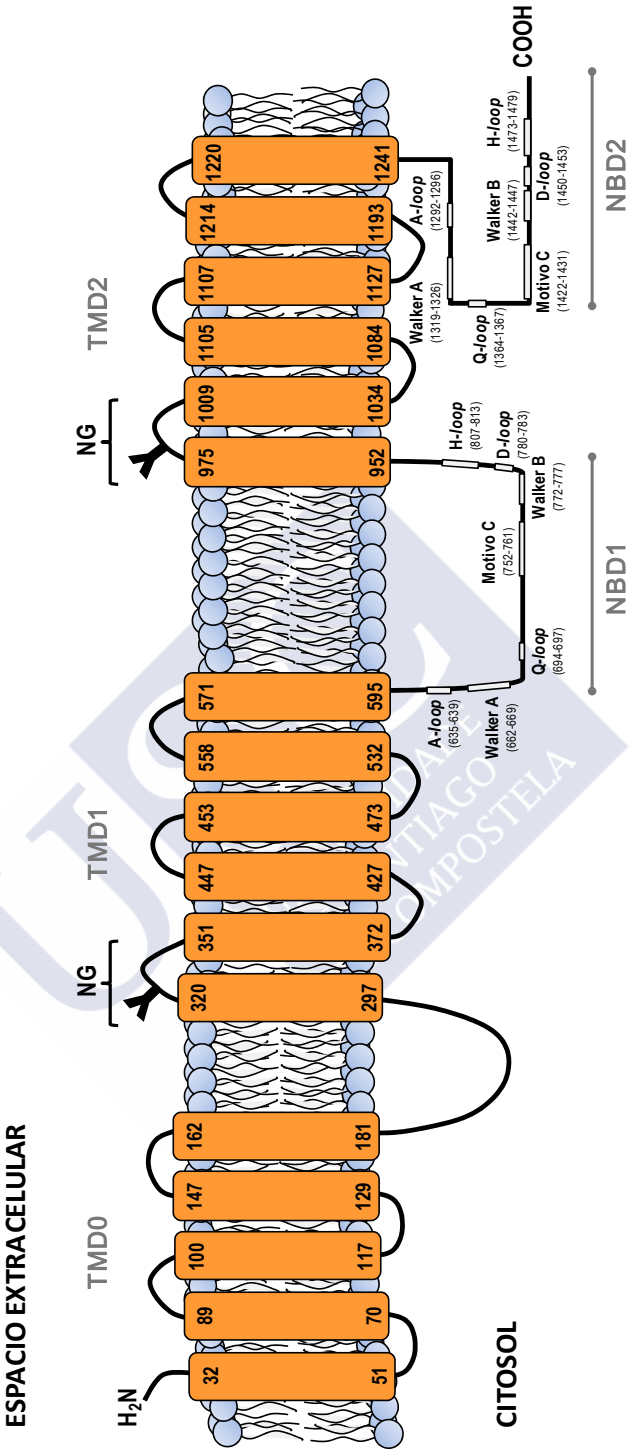


Figura 25 (continuación)

Tabla 6. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína MRP1 (FM999810) de *Mytilus galloprovincialis* con proteínas de la familia ABCC en otras especies.

Especie	Núm. Acceso	Phylum	Descripción	Identidad con MRP1 (%)
<i>Mytilus californianus</i>	ABS83557	Mollusca	ABCC/MRP-like protein	85
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC24314	Mollusca	MRP 1	50
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC26649	Mollusca	MRP 4	36
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC26522	Mollusca	MRP 5	34
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC30465	Mollusca	MRP 7	39
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC25348	Mollusca	MRP 9	37
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	AFH89632	Echinodermata	MRP 1	46
<i>Daphnia pulex</i>	GL732596	Arthropoda	Transportador ABC	50
<i>Ciona intestinalis</i>	EAAA01002387	Chordata	Transportador ABC	49
<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9I7N0	Arthropoda	MRP 1-like, isoforma B	48
<i>Leucoraja erinacea</i>	AAL92112.1	Chordata	MRP 2	48
<i>Squalus acanthias</i>	ABX38842.1	Chordata	MRP 3	45
<i>Danio rerio</i>	E7F872	Chordata	MRP 1	47
<i>Danio rerio</i>	CU462915	Chordata	MRP 2	50
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	ABJ55519.2	Chordata	MRP 2	46
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	ACX85035.1	Chordata	MRP 3	46
<i>Xenopus tropicalis</i>	AAMC01067229	Chordata	Abcc2	49
<i>Xenopus tropicalis</i>	AAI55697.1	Chordata	Abcc3	48
<i>Homo sapiens</i>	BAD92357.1	Chordata	ABCC1	48
<i>Homo sapiens</i>	AAC34668.1	Chordata	ABCC3	49
<i>Mus musculus</i>	BC090617	Chordata	Abcc1	48
<i>Mus musculus</i>	AF282772	Chordata	Abcc2	46
<i>Mus musculus</i>	AY841885	Chordata	Abcc3	47
<i>Rattus norvegicus</i>	AAN86532.1	Chordata	Abcc1	48

Tabla 7. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína MRP2 (HE599221) de *Mytilus galloprovincialis* con proteínas de la familia ABCC de otras especies.

Especie	Núm. Acceso	Phylum	Descripción	Identidad con MRP2 (%)
<i>Mytilus californianus</i>	ABS83557	Mollusca	ABCC/MRP-like protein	44
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC24314	Mollusca	MRP 1	53
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC26649	Mollusca	MRP 4	34
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC26522	Mollusca	MRP 5	34
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC30465	Mollusca	MRP 7	37
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC25348	Mollusca	MRP 9	35
<i>Daphnia pulex</i>	EFX72783.1	Arthropoda	Transportador ABC	44
<i>Ciona intestinalis</i>	EAAA01002387	Chordata	Transportador ABC	49
<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9VK56	Arthropoda	MRP 1-like, isoforma A	44
<i>Leucoraja erinacea</i>	AAL92112.1	Chordata	MRP 2	42
<i>Squalus acanthias</i>	ABX38842.1	Chordata	MRP 3	44
<i>Danio rerio</i>	XP_001341895	Chordata	MRP 1	45
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	ACX85035.1	Chordata	MRP 3	46
<i>Xenopus tropicalis</i>	F6TR94	Chordata	Abcc2	45
<i>Xenopus tropicalis</i>	NP_001107301	Chordata	Abcc3	44
<i>Homo sapiens</i>	NP_004987.2	Chordata	ABCC1	43
<i>Homo sapiens</i>	NP_000383.1	Chordata	ABCC2	43
<i>Homo sapiens</i>	CAA76658.2	Chordata	ABCC3	41
<i>Mus musculus</i>	NP_032602.1	Chordata	Abcc1	43
<i>Mus musculus</i>	NP_038834.2	Chordata	Abcc2	43
<i>Mus musculus</i>	NP_083876.3	Chordata	Abcc3	42
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_071617.2	Chordata	Abcc1	43
<i>Rattus norvegicus</i>	NP_036965.1	Chordata	Abcc2	40
<i>Rattus norvegicus</i>	O88563	Chordata	Abcc3	41

Las secuencias aminoacídicas de las proteínas MRP1 y MRP2 se compararon con las secuencias almacenadas en las bases de datos con el programa WU-blastp. Este análisis reveló que las secuencias de mejillón muestran una gran similitud con otras proteínas MRP de bivalvos y de vertebrados, lo que confirmó su identidad como transportadores ABC de la subfamilia ABCC. Una búsqueda de similitud con el programa WU-blastp mostró 85% de identidad con el mejillón *Mytilus californianus* ABCC; 50-34% de identidad con *Crassostrea gigas* Abcc1, Abcc4, Abcc5, Abcc7 y Abcc9; 50% de identidad con *Daphnia pulex* ABCC y; 48-49% de identidad con *Homo sapiens* ABCC1 y ABCC3 en el caso de MRP1 (Tabla 6). Las identidades de MRP2 fueron de 44% con el mejillón *Mytilus californianus* ABCC; 53-34% con *Crassostrea gigas* Abcc1, Abcc4, Abcc5, Abcc7 y Abcc9; 44% con *Daphnia pulex* ABCC y; entre 43-41% con *Homo sapiens* ABCC1, ABCC2 y ABCC3 (Tabla 7).

El alineamiento llevado a cabo con otras proteínas ABCC descritas previamente en otros vertebrados e invertebrados marinos muestra una similitud mayor al 40%. Después de la alineación de las secuencias con Clustal W2 se editaron con el programa GeneDoc v.2.7 para localizar las regiones conservadas. La oscuridad del sombreado representa el porcentaje de conservación: negro, 100%; gris oscuro, 80%; y gris claro, 60% (Figura 26).

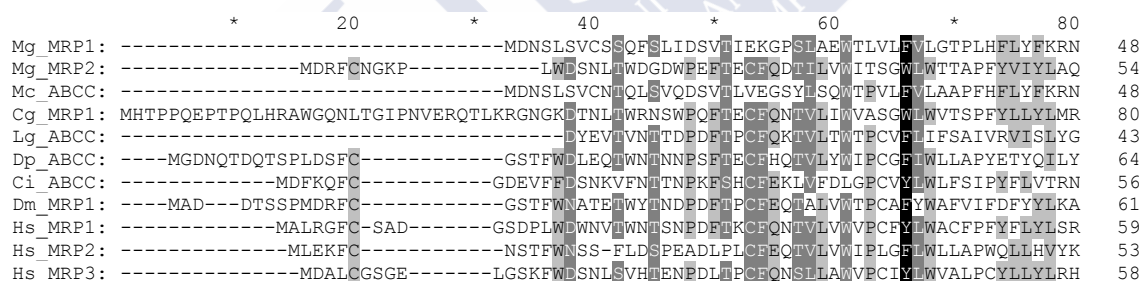


Figura 26. Alineamiento de MRP1 y MRP2 con diferentes proteínas ABCC de otras especies. Las regiones conservadas aparecen sombreadas: negro, 100%; gris oscuro, 80%; y gris claro, 60%. Mg_MRP1: *Mytilus galloprovincialis* MRP1 (CAX46412); Mg_MRP2: *Mytilus galloprovincialis* MRP2 (CCD42045); Mc_ABCC: *Mytilus californianus* (ABS83557); Cg_MRP1: *Crassostrea gigas* MRP1 (EKC24314); Lg_ABCC: *Lottia gigantea* (protein ID: 107213); Dp_ABCC: *Daphnia pulex* (protein ID: 347281); Ci_ABCC: *Ciona intestinalis* (protein ID: 285893); Dm_MRP1: *Drosophila melanogaster* MRP1 (AAF53223); Hs_MRP1: *Homo sapiens* ABCC1 (AAB46616); Hs_MRP2: *Homo sapiens* ABCC2 (CAA65259); Hs_MRP3: *Homo sapiens* ABCC3 (AB010887).

Figura 26 (continuación)

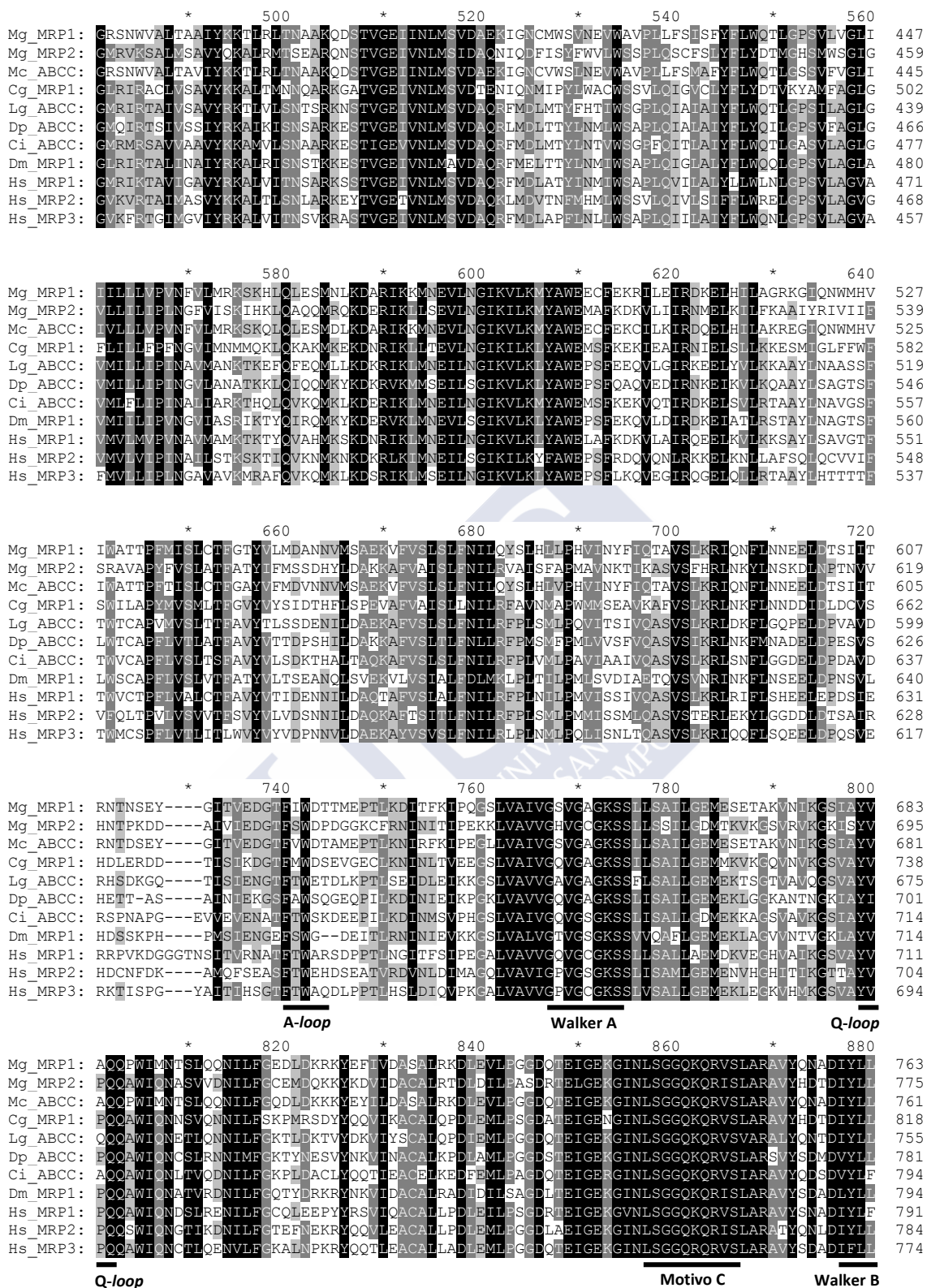


Figura 26 (continuación)

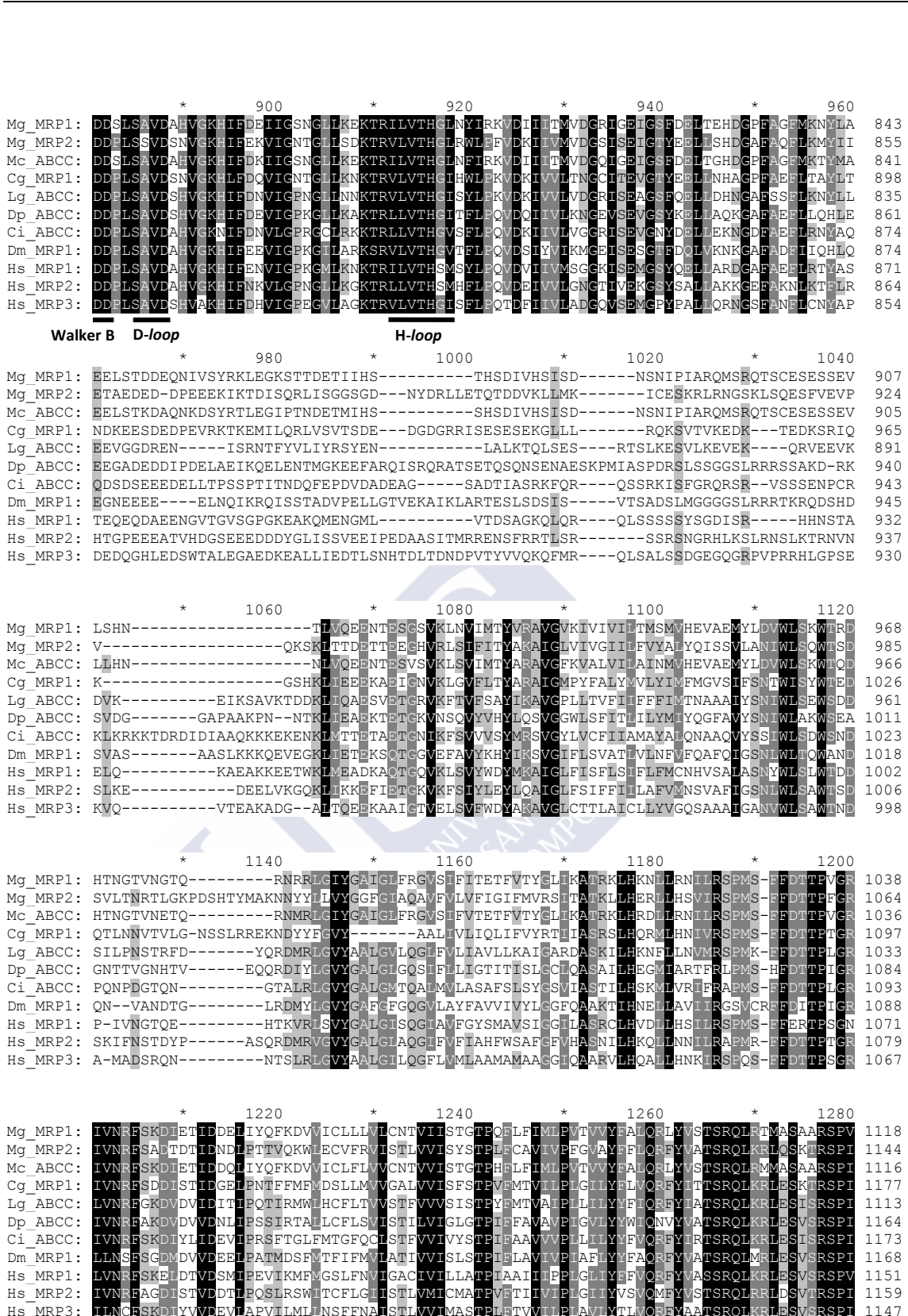


Figura 26 (continuación)

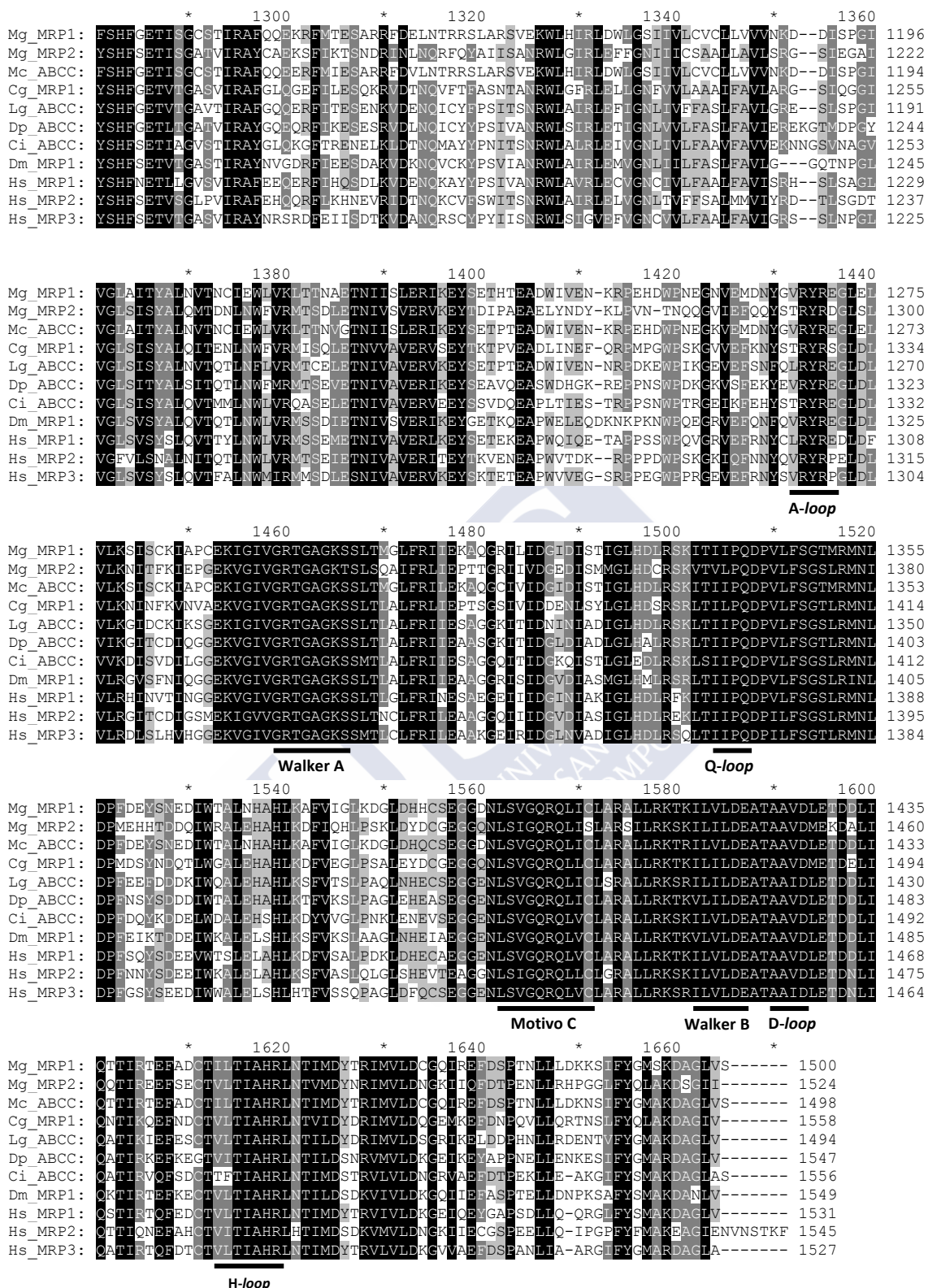


Figura 26 (continuación)

3.3.2.- Análisis filogenético.

Las proteínas MRP1 y MRP2 de *M. galloprovincialis* se compararon con proteínas de la subfamilia ABCC de vertebrados e invertebrados marinos. Más información de cómo se encuadran las dos nuevas proteínas de mejillón dentro de la familia ABCC se puede extraer del árbol filogenético construido con las secuencias de aminoácidos (Figura 27). En el árbol filogenético resultante las proteínas MRP1 y MRP2 aparecen dentro del *cluster* formado por miembros de ABCC1, ABCC2 y ABCC3 de humanos.

Figura 27. Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de las proteínas MRP1 y MRP2 obtenidas en *Mytilus galloprovincialis* y proteínas ABCC de otros invertebrados. La historia evolutiva fue inferida por el método de máxima verosimilitud basado en el modelo matricial Jones-Taylor-Thornton (Jones *et al.*, 1992). El árbol consenso (*bootstrap consensus tree*) inferido a partir de 2.000 repeticiones se tomó para representar la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein, 1985). El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtiene automáticamente de la siguiente manera. Cuando el número de sitios comunes era <100 o menos de la cuarta parte del número total, se utilizó el método de máxima parsimonia, de lo contrario se utilizó el método BIONJ con la matriz de distancia MCL. Se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias evolutivas entre los tipos de sitios (8 categorías (+ G, parámetro = 1,6179)). El alineamiento de las secuencias fue construido con el ClustalW 2.0.3 y el análisis filogenético se llevó a cabo en MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Las secuencias MgMRP1 y MgMRP2 están marcadas con un rombo negro. Los transportadores ABCC son los siguientes: *Multidrug resistance-associated protein* CeMrp-2 (AAB07022), CeMrp-3 (CAA92148), CeMrp-4 (CAB02667), CeMrp-5 (CAB54225), CeMrp-7 (CAA21622) y CeMrp-8 (CAA22110) para *Caenorhabditis elegans*; *MRP-like protein* DmCG10505 (AAF46706), DmCG11897 (AAF56869), DmCG11898 (AAF56870), DmCG14709 (AAF54656), DmCG31792 (NP_724148), DmCG31793 (NP_609930), DmCG4562 (AAF55707), DmCG5789 (AAF56312), DmCG6214 (AAF53223), DmCG7627 (AAF52648), DmCG7806 (AAF52639) y DmCG8799 (AAF58947) para *Drosophila melanogaster*; *ABC Transporters* hABCC1/MRP1 (AAB46616), hABCC2/MRP2 (CAA65259), hABCC3/MRP3 (AB010887), hABCC4 (NP_005836), hABCC5/MRP5 (AAB71758), hABCC6/MRP6 (AF076622), hABCC7/CFTR (AAC13657), hABCC8/SUR1 (AAB02278), hABCC9/SUR2 (AF061323), hABCC10/MRP7 (NP_258261), hABCC11/MRP8 (NP_149163) y hABCC12/MRP9 (NM_033226) para *Homo sapiens*; Transportadores ABCC Dp347281 (EFX72783), Dp347292 (*protein ID* 227373), Dp347295 (*protein ID* 58685) y Dp442500 (*protein ID* 63126) para *Daphnia pulex*. *ABCC-like protein* McABCC (ABS83557) de *Mytilus californianus*; CgABCC1 (EKC24314), CgABCC4 (EKC26649), CgABCC5 (EKC26522), CgABCC7 (EKC30465) y CgABCC9 (EKC25348) de *Crassostrea gigas*; SpABCC1 (AFH89632), SpABCC5a (AFC36360) y SpABCC9a (AFH89642) de *Strongylocentrotus purpuratus*, TaABCC (XP_002116818) de *Trichoplax adhaerens*; MgMRP1 (FM999810) y MgMRP2 (HE599221) de *Mytilus galloprovincialis*. *Protein ID* de las secuencias utilizadas para el análisis están disponibles en el portal de JGI genome <http://www.jgi.doe.gov/Daphnia>.

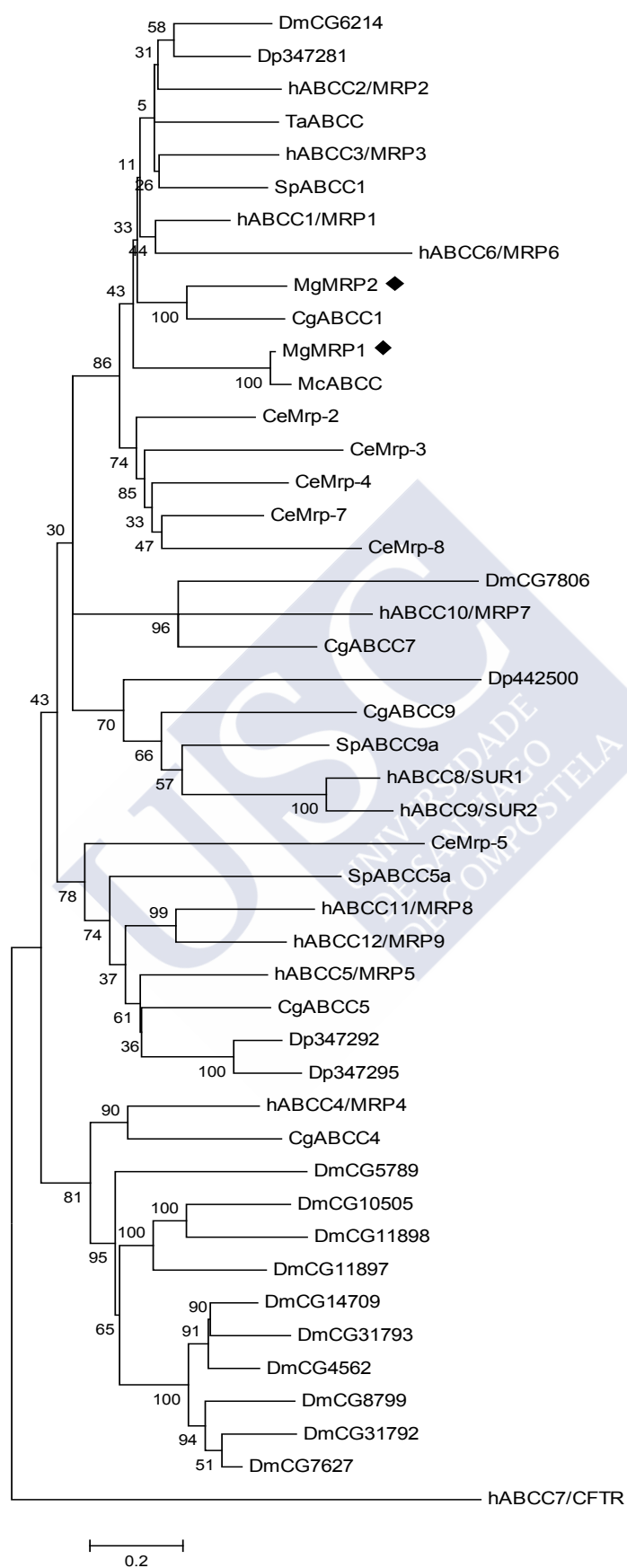


Figura 27

3.4.- DISCUSIÓN.

El empleo de técnicas de biología molecular ha permitido la caracterización de dos proteínas que pertenecen a la familia de transportadores conocidos como transportadores ABC en el mejillón *M. galloprovincialis*. Ambas proteínas pertenecen concretamente a la subfamilia ABCC que incluye varios transportadores conocidos como proteínas de multirresistencia frente a fármacos (MRP).

Las proteínas MRP1 y MRP2 de mejillón presentan la topología característica de los transportadores ABC que comprende dos regiones TMD con seis segmentos α -hélice transmembrana seguidas cada una de un dominio de unión a nucleótido (NBD). Además, como característica especial de la subfamilia ABCC, contiene un tercer dominio adicional TMD0 amino terminal con cinco segmentos transmembrana y cuyo extremo amino-terminal es extracelular (Bakos *et al.*, 1996; Hipfner *et al.*, 1997). Cada dominio NBD contiene los tres motivos consenso Walker A, Walker B y motivo C, además de dichos motivos existen otras regiones conservadas como el A-loop, Q-loop, D-loop y H-loop (Ambudkar *et al.*, 2006). El papel del tercer dominio extra junto con el segmento citoplasmático 0 (L_0) que une al TMD0 con el TMD1 no está muy claro pero parece que es necesario para el correcto funcionamiento y localización de la proteína (Bakos *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1998; Westlake *et al.*, 2005). En las proteínas ABCC existen ciertas diferencias estructurales entre sus NBD. Entre esas diferencias destaca el residuo de Glu (E) situado inmediatamente después del Walker B. En el NBD1 de MRP y SUR, este residuo es Asp (D) y en CFTR es Ser (S), mientras que en el NBD2 de todas las proteínas ABCC es Glu (E). En el NBD1 de *M. galloprovincialis* de ambas proteínas (MRP1 y MRP2) este residuo es Asp (D), mientras que en el NBD2 es Glu (E). Ciertos estudios en los que se llevó a cabo la sustitución de estos residuos (Asp y Glu) y la mutación a aminoácidos que carecen de cadenas laterales de carboxilato afectan a la habilidad de los NBD para unir, hidrolizar y liberar (Payen *et al.*, 2003). Otra característica es la que afecta al motivo C en el NBD2 de proteínas ABCC. El motivo se caracteriza por presentar la secuencia consenso LSGGQ(Q/R/K)QR además de los residuos conservados Arg (R) y Ser (S) en las posiciones 8 y 10. En el NBD2 de algunos miembros como MRP1, CFTR y SUR el núcleo de este motivo varía a LSVGQ, LSHGH, y FSQGQ respectivamente (Riordan *et al.*, 1989; Cole *et al.*, 1992; Aguilar-Bryan *et al.*, 1995), y los residuos 8 y 10 están sustituidos por Leu (L) y Cys (C) en la mayoría de los miembros (Payen *et al.*, 2003, 2005). En *M. galloprovincialis* el núcleo conservado del motivo C (LSGGQ) se mantiene en el NBD1 y varía en el NBD2. La proteína MRP1 contiene la secuencia **LSVGQRQLIC** mientras que MRP2 presenta la secuencia **LSIGQRQLIS**. En cuanto a los residuos 8 y 10 ambas proteínas mantienen

los residuos de Arg (R) y Ser (S) en el NBD1, mientras que en el NBD2 están sustituidos por Leu (L) y Cys (C) en la proteína MRP1 y por Leu (L) y Ser (S) en MRP2. En el NBD2, el núcleo conservado del motivo C de la proteína MRP1 de mejillón coincide con el que presenta la proteína MRP1 de humanos: LSVGQ, mientras que, en la proteína MRP2 de mejillón la secuencia LSIGQ coincide con la que muestra la proteína MRP2 de humanos. En cuanto al motivo *A-loop* la mayoría de los transportadores ABCC contienen en el primer NBD1 el residuo de triptófano (Trp, W), y en algunos miembros como ABCC5, ABCC11 y ABCC12 el ácido glutámico (Glu, E), mientras que en CFTR ese residuo es fenilalanina (Phe, F). En el NBD2 todos los miembros de esta subfamilia presentan el residuo aromático tirosina (Y) (Ambudkar *et al.*, 2006). En ambas proteínas de mejillón el NBD1 contiene como residuo aromático el triptófano (Trp, W) y el NBD2 la tirosina (Tyr, Y).

En vertebrados la localización celular de la proteína MRP1 es en la membrana basolateral mientras que MRP2 se localiza en la membrana apical. Existen diversos estudios enfocados a determinar que señales están implicadas en la diferente localización de ambas proteínas. Recientemente se ha identificado una pequeña región de tres aminoácidos en el extremo carboxi-terminal de CFTR. Este grupo de aminoácidos se denomina dominio de unión a PDZ (dominios modulares de interacción entre proteínas). Harris *et al.* (2001) identificaron la presencia de un motivo muy parecido en el extremo carboxi-terminal de la proteína MRP2 formado por los aminoácidos TKF (treonina, lisina y fenilalanina) pero ausente en MRP1. Al suprimir esos aminoácidos la proteína pasa a localizarse predominantemente en la membrana lateral de las células polarizadas. En 2008, Bandler *et al.* señalaron la importancia de la presencia de un motivo rico en lisina (Lys, K) entre las posiciones aminoácidas 294 y 303 en la región carboxi-proximal del L₀ para la localización celular de la proteína (Bandler *et al.*, 2008). Westlake *et al.* (2003) definieron la región del segmento citoplasmático L₀ necesaria para la localización basolateral de la proteína MRP1. La parte amino-proximal del L₀ es una pequeña zona muy conservada entre las proteínas ABCC que presentan los tres dominios transmembrana y el extremo amino-terminal de aquellas ABCC que carecen de ese dominio adicional (Grant *et al.*, 1997). Concluyeron que los límites funcionales amino- y carboxi-proximal del L₀ correspondían a los aminoácidos Cys²⁰⁸ y Asn²⁶⁰ respectivamente.

En ambas proteínas de mejillón las características antes mencionadas para determinar si alguno de ellos tiene una localización apical o basolateral en la membrana celular no llegan a cumplirse totalmente. La proteína MRP1 de mejillón no cumple ninguno de los requisitos para presentar una localización basolateral. A las posiciones 208 y 260, que corresponderían en la proteína MRP1 de humanos, en mejillón aparecen

ocupadas por una serina (Ser, S) y tirosina (Tyr, Y) respectivamente, en vez de presentar los aminoácidos cisteína (Cys, C) y asparagina (Asn, N). En el caso de la proteína MRP2 de mejillón ambas posiciones exhiben el mismo aminoácido, asparagina (Asn, N), por lo que sólo la posición 260 cumple uno de los requisitos. En cuanto a la localización apical, ambas proteínas de mejillón presentan un par de lisinas (Lys, K) en las posiciones que corresponderían a los aminoácidos entre 294 y 303 de la proteína MRP2 de humanos. En lo relativo a los dominios de unión a PDZ, ninguna de las dos proteínas de mejillón contiene los motivos típicos de alguna de las tres clases de dominios PDZ.

En los últimos años se han realizado diversos trabajos en la caracterización de proteínas de multirresistencia frente a xenobióticos en diferentes organismos marinos. En invertebrados como los moluscos bivalvos, gasterópodos, crustáceos y equinodermos se han identificado varios genes que codifican para proteínas pertenecientes a las subfamilias ABCB y ABCC. Annilo *et al.* (2006) obtuvieron seis miembros de la familia ABCC en genoma del urocordado *Ciona intestinalis*. Estudios llevados a cabo por Luckenbach y Epel en *Mytilus californianus* consiguieron la clonación y el análisis de secuencias proteicas de dos genes de las subfamilias ABCB y ABCC en el tejido de branquia (Luckenbach y Epel, 2008). En el manto del mejillón atlántico, *Mytilus edulis*, se identificaron dos fragmentos de proteínas MRP nombradas como *mrp1* y *mrp2* (Luedeking *et al.*, 2005). Otras secuencias parciales de genes implicados en la multirresistencia frente a xenobióticos (MXR) se obtuvieron en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*, dos pequeños fragmentos de aproximadamente 400 pb descritos como *Pgp* y *Mrp2* (Franzellitti y Fabbri, 2006). Navarro *et al.* (2012) identificaron una secuencia parcial homóloga al gen *abcc1/Abcc1* en el mejillón cebra *Dreissena polymorpha*. Los estudios realizados por Whalen *et al.* (2010) en el gasterópodo *Cyphoma gibbosum* caracterizaron dos transportadores ABC pertenecientes a la subfamilia C (*abcc1* y *abcc2*) al igual que en el nudibranquio *Tritonia hamnerorum* (*abcc1* y *abcc2*). Sturm *et al.* (2009) identificaron en el genoma del crustáceo *Daphnia pulex* siete transportadores ABCC. Goldstone *et al.* (2006) abordaron el estudio de las familias de genes implicadas en la protección frente a sustancias químicas de estrés en el erizo *Strongylocentrotus purpuratus*. El trabajo permitió la identificación de 65 genes pertenecientes a las ocho subfamilias ABC. En el erizo, la subfamilia ABCC es aproximadamente un 25% mayor que en el genoma de otros deuteróstomos, con al menos 30 genes caracterizados. Recientemente, Gökirmak *et al.* (2012) han obtenido la secuencia completa de tres miembros de la subfamilia ABCC, concretamente los genes *abcc1*, *abcc5a* y *abcc9a* en embriones de *Strongylocentrotus purpuratus*.

En peces, en los últimos años han aumentado los estudios sobre esta familia de transportadores. En los peces cartilagosos *Raja erinacea* y *Squalus acanthias* se han obtenido la secuencia completa de una proteína ABCC, un ortólogo del gen *MRP2/Mrp2* en hígado de la raya (Cai *et al.*, 2003) y en células madre mesenquimales de la mielga el gen *Mrp3* respectivamente (Kobayashi *et al.*, 2007). En varios peces teleósteos como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) se han llevado a cabo estudios de clonación y caracterización de genes que codifican para diferentes tipos de proteínas transportadoras ABC. Annilo *et al.* (2006) identificaron en el genoma de la trucha arco iris 13 miembros que pertenecen a la subfamilia ABCC; Zaja *et al.* (2008a) describieron en hepatocitos los genes *Abcb1*, *Abcc2* y *Abcb11*; Fischer *et al.* (2010) obtuvieron secuencias parciales de dos genes *abcc1* y *abcc3* a partir de la línea celular (RTgill-W1) procedente del tejido de branquia y un año después tres secuencias parciales *abcb1b*, *abcc4* y *abcc5* se clonaron a partir de la línea celular (RTL-W1) procedente del hígado (Fischer *et al.*, 2011). Zaja *et al.* (2007) detectaron los transportadores *Pgp1* y *Mrp3* en líneas celulares del carcinoma hepatocelular de *Poeciliopsis lucida* (PLHC-1). En embriones y tejidos adultos del pez cebra, *Danio rerio*, se caracterizó un fragmento del gen *abcc1* (Long *et al.*, 2011a), el gen *abcc2* en hígado (Long *et al.*, 2011d) y el gen *abcc5* en cerebro (Long *et al.*, 2011b). Sauerborn *et al.* (2004) identificaron en el salmonete de fango *Mullus barbatus* un pequeño fragmento de 204 pb del gen *mrp2*, y en 2010 determinaron la presencia de varios transportadores pertenecientes al sistema MXR, *Pgp* y *Abcc* genes, en cinco especies de ciprinidos (Sauerborn *et al.*, 2010). En 2012 de Cerio *et al.* (2012) caracterizaron varios fragmentos que codifican para proteínas ABC, dos de ellas pertenecen a la subfamilia B (*abcb1* y *abcb11*) y tres a la subfamilia C (*abcc1*, *abcc2* y *abcc3*) en *Chelon labrosus*. En el pez antártico *Trematomus bernacchii*, Zucchi *et al.* (2010), identificaron varias secuencias parciales de genes: *Abcb1*, *Abcc1*, *Abcc2*, *Abcc4* y *Abcc9*.

Los análisis filogenéticos revelaron un alto grado de similitud de ambas proteínas con los miembros ABCC1, ABCC2 y ABCC3 de humanos, los cuales están relacionados con la multirresistencia frente a fármacos (Kruh y Belinsky, 2003; Deeley *et al.*, 2006). De hecho, dentro de la subfamilia ABCC, ABCC1 y ABCC2 son los principales transportadores de xenobióticos en vertebrados (Kruh y Belinsky, 2003; Leslie *et al.*, 2005). Estos resultados hacen que ambos transcritos de mejillón se incluyan dentro de este grupo. En conclusión, los resultados mostrados en el presente capítulo caracterizan, por primera vez, la secuencia completa del cDNA que codifica para dos proteínas de membrana pertenecientes a la subfamilia ABCC en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*.



4. CAPÍTULO II:

**Clonación del cDNA que codifica para
una proteína de la subfamilia ABCG
en *Mytilus galloprovincialis***



4.1.- INTRODUCCIÓN.

La *subfamilia ABCG (White)* comprende en humanos 5 miembros que se caracterizan por presentar una organización de sus dominios inversa a la del resto de transportadores ABC, con un único NBD en el extremo amino y un TMD formado por seis segmentos α -hélice en el extremo carboxilo (Wang *et al.*, 2008). Todas las proteínas ABCG de humanos están formadas por semi-transportadores aunque se han descrito transportadores completos con la organización (NBD-TMD)₂ en *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana*. Para ser funcionalmente activos estos transportadores forman dímeros unidos por puentes disulfuro, bien homodímeros (ABCG1, ABCG2 y ABCG4) o heterodímeros (ABCG5 y ABCG8).

Debido a su topología inusual se han sugerido dos posibles rutas para explicar la evolución de esta subfamilia de proteínas (Anjard y Loomis, 2002). La primera teoría defiende que la ABCG original, donde el NBD precede al TMD, apareció de la fusión de regiones independientes que codificaban dichos dominios. A partir de nuevos datos obtenidos de la secuencia genómica de *Dictyostelium discoideum*, Anjard y Loomis (2002) propusieron una segunda teoría donde el gen *ABCG* podría haberse originado a partir de la región central de un transportador ABC completo de las subfamilias A, B o C (TMD-NBD)₂ tras la pérdida del primer TMD y del segundo NBD. La duplicación en tándem y fusión de los semi-transportadores ABCG podría haber dado lugar a los transportadores completos de la subfamilia ABCG (Lorkowski y Cullen, 2002) (Figura 28).

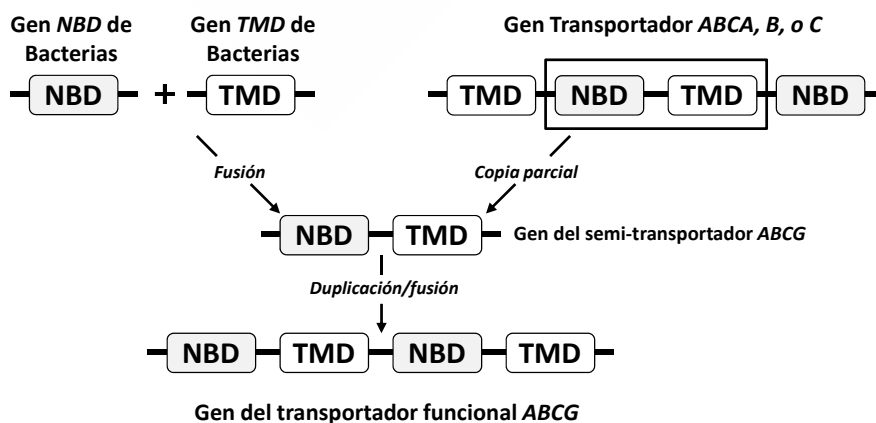


Figura 28. Evolución de la subfamilia ABCG. El ABCG original, donde el NBD precede al TMD, apareció de la fusión de regiones independientes que codificaban dichos dominios. Otra alternativa es que el gen *ABCG* se originó a partir de la región central de un transportador ABC completo de las subfamilias A, B o C. La duplicación en tándem y fusión de los semi-transportadores ABCG originó los transportadores completos de la subfamilia ABCG (Modificado de Anjard y Loomis, 2002).

El primer miembro de esta subfamilia es la proteína ABCG1 descrita de manera independiente por tres grupos a partir de una línea de macrófagos de ratones P388D1 (Savary *et al.*, 1996), de retina humana y cerebro de feto (Chen *et al.*, 1996) y de la línea celular de leucemia *Jurkat T-cell* (Croop *et al.*, 1997) como el homólogo del gen *white* de *Drosophila*. El gen *ABCG2* humano fue clonado en 1998 por Doyle *et al.* a partir de una línea celular MCF7 de cáncer de mama resistente a doxorubicina y recibió el nombre de BCRP (*Breast Cancer Resistance Protein*) (Doyle *et al.*, 1998). Posteriormente, dos proteínas casi idénticas en secuencia de aminoácidos con BCRP fueron clonadas por dos laboratorios independientes que la denominaron como MXR (*Mitoxantrone Resistance Protein*) (Miyake *et al.*, 1999) y ABCP (*Placental ABC Protein*) (Allikmets *et al.*, 1998). Actualmente, siguiendo la recomendación de HUGO (*Human Genome Nomenclature Committee*) se le designa como ABCG2. La proteína ABCG4, fue identificada por dos grupos diferentes basándose en su homología con ABCG1 (Annino *et al.*, 2001; Oldfield *et al.*, 2002). La proteína ABCG5 fue identificada como el homólogo humano de la isoforma de roedor que se indujo en el hígado y en el intestino delgado mediante el tratamiento con un agonista del receptor hepático X (LXR) (Berge *et al.*, 2000). Más tarde, el gen *ABCG8* humano, se clonó como un homólogo adyacente a *ABCG5* (Berge *et al.*, 2000).

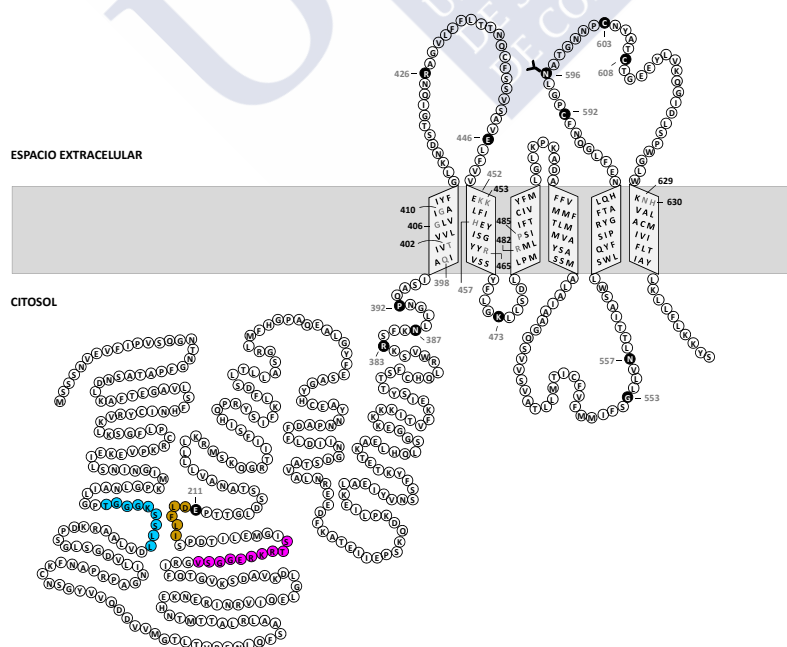
La única característica que diferencia a las proteínas ABCG de otras proteínas ABC es su unidad básica. La mayoría de los transportadores ABC poseen dos mitades repetidas cada una con un TMD y un NBD. Por el contrario, la subfamilia ABCG presenta un único NBD en el extremo amino seguido de un TMD. Para que el transportador sea funcional es necesaria la cooperación de dos TMD y dos NBD que forman la vía a través de la cual se lleva a cabo el transporte del sustrato. Las proteínas ABCG funcionan formando homodímeros (ABCG1, ABCG2 y ABCG4) o heterodímeros (ABCG5 y ABCG8). La mayoría de los estudios de dimerización se centran en la proteína ABCG2. Son varios los residuos o motivos localizados en los segmentos transmembrana o segmentos extracelulares que intervienen en el proceso de formación de dímeros. Diversos estudios demuestran la existencia de interacciones físicas en la formación de homodímeros mediante enlaces disulfuro. Existe una región que comprende el TM5, el segmento extracelular (relativamente más largo) y el TM6 con actividad oligomérica en la proteína ABCG2 de humanos. En ese segmento extracelular hay tres residuos de cisteína (Cys, C): 592, 603 y 608 que están implicados en la formación de los enlaces disulfuro. En concreto, Cys⁶⁰³ forma un enlace disulfuro intermolecular mientras que Cys⁵⁹² y Cys⁶⁰⁸ forman un enlace disulfuro intramolecular (Kage *et al.*, 2002, 2005; Henriksen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008; Mo *et al.*, 2012). Polgar *et al.* (2006) estudiaron la implicación del residuo de Gly⁵⁵³, del TM5, en la formación de los dímeros. La mutación de la Gly⁵⁵³ por Leu (L) o Glu (E) reduce la

expresión de la proteína, provoca daños en la glucosilación y la proteína queda retenida en el retículo endoplasmático (Polgar *et al.*, 2006). En el TM1 de algunos miembros de la subfamilia ABCG aparece un motivo altamente conservado: GXXXG (donde X es cualquier aminoácido) relacionado con el proceso de dimerización en proteínas como la glicoporfirina A, la anhidrasa carbónica de humanos, etc. (Polgar *et al.*, 2004). Varios estudios sugieren la formación de oligómeros de ABCG2, siendo el tetrámero la forma funcional (Xu *et al.*, 2004). Sin embargo, en las células de insecto la ABCG2 aparece en forma octamérica, como un tetrámero de dímeros (McDevitt *et al.*, 2006). Aunque se desconoce la función de estos oligómeros, su formación podría afectar a la actividad de transporte de la proteína. Por su parte, AGCG5 y ABCG8 funcionan como heterodímeros (Graf *et al.*, 2003).

El interés por precisar la estructura y función del transportador ABCG2 se ha realizado empleando estudios de mutagénesis en residuos concretos. Cambios en un único aminoácido pueden alterar la estabilidad y expresión de la proteína, su capacidad de hidrolizar ATP, su distribución subcelular o cambiar la especificidad por el sustrato. Estos estudios pueden dividirse en cuatro categorías resumidas en la Tabla 8 y Figura 29. La primera englobaría aquellas mutaciones que no afectan a la expresión en la membrana plasmática pero que alteran la especificidad por el sustrato y/o la actividad de transporte. En este grupo, la Arg⁴⁸², situada en el TM3, ha sido la más estudiada. El cambio de arginina (Arg, R) a treonina (Thr, T) o glicina (Gly, G) en esta posición altera la especificidad por el sustrato. Los estudios demostraron que el transporte de rodamina 123 dependía del aminoácido presente en la posición 482. Una glicina o treonina en esa posición permitía el transporte de rodamina 123 mientras que una arginina no. Estos resultados indican que la mutación en este residuo incrementan la capacidad de transporte, es decir, una mutación de ganancia de función (Honjo *et al.*, 2001; Ozvegy *et al.*, 2002; Miwa *et al.*, 2003; Ejendal *et al.*, 2006; Pozza *et al.*, 2006).

Tabla 8. Estudios de mutagénesis en la proteína ABCG2 de humanos (Modificado de Ni *et al.*, 2010b).

MUTACIÓN	POSICIÓN EN ABCG2	EFFECTO
Glu ²¹¹	Adyacente al Walker B	Elimina la actividad ATPasa y el transporte
Arg ³⁸³	Linker entre NBD-TMD	Aumenta la degradación y baja la estabilidad de la proteína y altera la distribución subcelular y glucosilación
Asn ³⁸⁷ , Gln ³⁹⁸ , Thr ⁴⁰²	Cerca o dentro de TM1	Disminuye la actividad de transporte
Pro ³⁹² , Pro ⁴⁸⁵	Linker entre NBD-TMD, TM3	Disminuye la actividad de transporte
Gly ⁴⁰⁶ , Gly ⁴¹⁰	GXXXG en TM1	Afecta a la actividad ATPasa y al transporte
Arg ⁴²⁶	Segmento extracelular 1	Aumenta la degradación y baja la estabilidad de la proteína
Glu ⁴⁴⁶	Segmento extracelular1	Elimina la resistencia frente a fármacos
Lys ⁴⁵² , His ⁴⁵⁷	TM2	Aumenta la actividad de transporte y resistencia frente a fármacos
Lys ⁴⁵³ , Arg ⁴⁶⁵	TM2	Disminuye la actividad de transporte y resistencia frente a fármacos
Lys ⁴⁷³	Segmento intracelular 1	Sin efectos en el transporte o resistencia frente a fármacos
Arg ⁴⁸²	TM3	Altera la especificidad por el sustrato (Ganancia de función)
Gly ⁵⁵³	Segmento intracelular 2	Afecta al tráfico, expresión y glucosilación
Asn ⁵⁵⁷	Segmento intracelular 2	Baja resistencia frente a ciertos fármacos
Asn ⁵⁹⁶	Segmento extracelular 3	Zona de N-glucosilación
Cys ⁵⁹² , Cys ⁶⁰⁸	Segmento extracelular 3	Afecta a la expresión y función
Cys ⁶⁰³	Segmento extracelular 3	Sin efectos en la expresión, función y formación de enlaces disulfuro
Asn ⁶²⁹	TM6	Aumenta la actividad de transporte
His ⁶³⁰	TM6	Sin efectos en la resistencia frente a fármacos

**Figura 29.** Ilustración de la topología de membrana de la proteína ABCG2 de humanos. Se indican los motivos Walker A, Walker B y Motivo C, y se señalan los diferentes residuos aminoacídicos analizados en varios estudios. El aminoácido Asn⁵⁹⁶, como único sitio de glucosilación, aparece marcado (Modificado de Ni *et al.*, 2010b).

Ni *et al.* (2010a) estudiaron los efectos de varios residuos polares localizados dentro o cerca de los TM1 y TM6 en la interacción entre el sustrato y ABCG2. Mutaciones en los residuos Asn³⁸⁷, Gln³⁹⁸ y Thr⁴⁰² disminuyen el transporte de sustratos mientras que en el residuo Asn⁶²⁹ se observa un aumento en el transporte (Ni *et al.*, 2010a). Los mismos autores observaron que varios residuos de prolina localizados cerca o dentro de los segmentos transmembrana alteran el transporte de ABCG2. El residuo Pro³⁹² afecta a la actividad de transporte mientras que la Pro⁴⁸⁵ interviene en la selectividad del sustrato. Los residuos de prolina son más frecuentes en los segmentos α -hélice de las proteínas de membrana que en la α -hélice de las proteínas solubles. Estos aminoácidos se localizan preferiblemente en posición central o terminal en los segmentos α -hélice. En posición terminal pueden romper la α -hélice; en posición central pueden introducir una región flexible en el centro de la hélice (Cordes *et al.*, 2002). Esto es lo que se observa exactamente en el TM3 de ABCG2. La Pro⁴⁸⁵ se localiza en la región central del segmento y crea una zona flexible que permite a la proteína alojar los distintos sustratos. En el segmento intracelular, que conecta el NBD con el TMD, se localiza el residuo de Pro³⁹² cuya función es comunicar ambos dominios durante el ciclo de transporte.

La segunda categoría comprende las mutaciones que afectan a la estabilidad de la proteína, su expresión y su distribución subcelular. La mutación de la Arg³⁸³ disminuye el nivel de la proteína debido a una retención parcial en el retículo endoplasmático y altera la glucosilación (Polgar *et al.*, 2009). De igual forma, la sustitución en el residuo Arg⁴²⁶ conduce a unos niveles bajos de expresión de la proteína (Ni *et al.*, 2010b). La sustitución de los residuos de Gly⁴⁰⁶ y Gly⁴¹⁰ por leucina derivan en una baja expresión de ABCG2 posiblemente causada por el aumento en la degradación, así como la pérdida de la hidrólisis de ATP y el transporte de sustratos (Polgar *et al.*, 2004). Otro residuo en el que se observa la rápida degradación y retención de la proteína en el retículo endoplasmático es la Gly⁵⁵³. Los residuos de Cys⁵⁹² y Cys⁶⁰⁸ también afectan a la localización y función de ABCG2 (Henriksen *et al.*, 2005).

La tercera categoría está formada por las mutaciones que causan alteraciones en la glucosilación o en la formación de puentes de disulfuro. El único sitio de glucosilación en ABCG2 es la Asn⁵⁹⁶. Según Mohrmann *et al.* (2005) y Diop y Hrycyna (2005) la ausencia de glucosilación no afecta ni a la expresión, localización o función del transportador. La mutación Cys⁶⁰³ tampoco afecta a la expresión o a la función del transportador, sugiriendo que participa en la formación de los enlaces de disulfuro intermoleculares (Henriksen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008; Shigeta *et al.*, 2010).

En la cuarta categoría se incluyen las mutaciones que no tienen demasiado efecto en la expresión y función de la proteína ABCG2. Este grupo presenta mutaciones

en los residuos Lys⁴⁷³ e His⁶³⁰ que parecen ser poco importantes en la expresión y en la función de la proteína (Miwa *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2010).

La expresión y distribución del gen *ABCG1* es amplia, se ha observado que es mayor en tejidos ricos en macrófagos como el bazo, pulmón y timo así como en el cerebro (Chen *et al.*, 1996; Savary *et al.*, 1996). Esta proteína está implicada en el transporte de colesterol y fosfolípidos (preferentemente esfingomielina) (Kobayashi *et al.*, 2006). *ABCG4* está principalmente expresada en el cerebro y ojo y sus principales sustratos son los lípidos. A nivel subcelular, tanto *ABCG1* como *ABCG4* se localizan en vesículas intracelulares en el cerebro (Tarr y Edwards, 2008) mientras que, en otros tipos celulares parece que se localizan intracelularmente así como en la membrana plasmática (Kobayashi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). La proteína *ABCG2* de humanos, localizada en la membrana apical de las células, está sobreexpresada en líneas celulares resistentes a fármacos y tumores lo que sugiere un papel en la multirresistencia frente a fármacos (MDR). También se encuentra en muchos tejidos normales como placenta, intestino delgado y grueso, sistema nervioso central, hígado, glándula adrenal, próstata, testículo, útero, cerebro, próstata, estómago, pulmón, riñón y células madre (Maliepaard *et al.*, 2001; Gutmann *et al.*, 2005). *ABCG2* transporta un amplio rango de sustratos que se solapan en parte con los de P-gp y MRP1. Las moléculas que transporta son hidrofóbicas, con carga positiva o negativa y de carácter anfipático, entre las que se encuentran los fármacos y sus metabolitos parcialmente detoxificados, toxinas, y compuestos endógenos. Esta proteína, como en el caso de P-gp, no requiere del glutatión para transportar los sustratos, mientras que MRP1 sí lo necesita. *ABCG5* y *ABCG8* se expresan mayoritariamente en la membrana apical de todo el tracto gastro-intestinal, el hígado y la vesícula biliar (Klett *et al.*, 2004; Ismail *et al.*, 2009). La co-expresión de ambos es necesaria para el transporte de esteroides neutros (Tabla 9).

Tabla 9. Lista de proteínas ABCG de humanos. Se detalla los nombres originales de los genes, su expresión y función (Modificado de Lorkowski y Cullen, 2002).

GEN	ALIAS	EXPRESIÓN	FUNCIÓN
<i>ABCG1</i>	<i>ABC8, White</i>	Bazo, pulmón, timo, cerebro	Transporte de lípidos
<i>ABCG2</i>	<i>ABCP, MXR, BCRP</i>	Placenta, intestino, hígado, próstata, cerebro, pulmón, células madre, etc.	Multirresistencia frente a fármacos
<i>ABCG4</i>	<i>White2</i>	Cerebro y ojo	Transporte de lípidos
<i>ABCG5</i>	<i>White3, Sterolin 1</i>	Hígado, tracto grasto-intestinal	Transporte de esteroides
<i>ABCG8</i>	<i>White4, Sterolin 2</i>	Vesícula biliar	Transporte de esteroides

El objetivo de este capítulo es la identificación y caracterización de genes *abcg* pertenecientes a la familia de transportadores ABC en la glándula digestiva del mejillón *Mytilus galloprovincialis*.

4.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.2.1.- Obtención de los animales.

Los mejillones (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) se recogieron del medio natural de bateas situados en la ría de Ares-Ferrol en junio de 2007 proporcionadas por el INTECMAR (Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño, Xunta de Galicia).

De cada mejillón se extrajeron los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto. Tras la disección, las muestras se almacenaron en *RNAlater*[®] (Ambion, ref. 7024) a -20°C según las instrucciones del fabricante.

4.2.2.- Extracción de RNA y transcripción inversa.

Para la extracción de RNA se emplearon muestras de tejido de glándula digestiva (aproximadamente 50 mg de muestra) conservadas a -20°C. La extracción de RNA se realizó con el kit comercial *RNAqueous*[®] (Ambion, ref. AM1912) según las instrucciones del fabricante. La muestra se sometió a una precipitación con cloruro de litio para eliminar el DNA. Una vez resuspendido el precipitado de RNA en 60 µL de *RNase-free* H₂O (Macherey-Nagel) se mezcló con medio volumen de la solución de cloruro de litio 7,5 M y se dejó incubar a -20°C toda la noche. A la mezcla se le añadió 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó durante 15 min a 4°C, la fase acuosa se descartó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. El RNA obtenido se resuspendió en 30 µL de una solución libre de RNasa, *RNA Storage Solution* (Ambion, ref. AM7001).

Las muestras de RNA se trataron con DNasa empleando el kit comercial *Turbo DNA-free*[™] (Ambion, ref. AM1907) y a continuación se estimó la concentración de RNA por espectrofotometría UV (ND-1000 de NanoDrop) utilizando la ecuación:

$$\text{Concentración del RNA } (\mu\text{g/mL}) = \text{Absorbancia a } 260 \text{ nm} \times 40$$

Sabiendo que para el RNA existe la relación 1 unidad de OD₂₆₀ = 40 µg.

Al volumen correspondiente de 0,8 µg de RNA total se le añadió los reactivos y la enzima *SuperScript[®] III RT* (Invitrogen, ref. 18080-051) para llevar a cabo la transcripción inversa siguiendo las indicaciones detalladas en el capítulo I en el apartado 3.2.2 de materiales y métodos (Tabla 10).

Tabla 10. Componentes, volumen y concentración final de los reactivos empleados en la transcripción inversa en el gen *abcg2* en *Mytilus galloprovincialis*.

Componente	Volumen (µL)	Concentración final
RNA total (0,8 µg)	x µL	
Random hexamers	1 µL	
dNTPs Mix	1 µL	10 mM de cada dNTP
DEPC Water	hasta 10 µL	
↓		
Incubar a 65°C durante 5 min, enfriar en hielo		
10X RT Buffer	2 µL	
Mg Cl ₂	4 µL (25 mM)	5 mM
Ditiotreitol (DTT)	2 µL (0,1M)	
RNase OUT TM	1 µL (40U)	
SuperScript TM III RT	1 µL (200U)	
↓		
Incubar a: 25°C durante 10 min, 50°C durante 50 min, 85°C durante 5 min		
RNase H	1 µL (2U)	
↓		
Incubar a 37°C durante 20 min		

4.2.3.- Amplificación del fragmento inicial y de los extremos 5' y 3' de cDNA del gen *abcg2*.

Se realizó una PCR con la muestra de cDNA obtenida en el proceso de transcripción inversa. Para amplificar una secuencia conservada del gen *abcg2* se diseñaron cebadores degenerados a partir de secuencias de proteínas similares de la base de datos del NCBI. Se utilizaron las secuencias de los transportadores ABCG de las siguientes especies: *Homo sapiens* (XM_002633346), *Ciona intestinalis* (XM_002125385), *Strongylocentrotus purpuratus* (XM_001193027) y *Caenorhabditis briggsae* (XM_002633346).

La reacción de PCR para el gen *abcg2* se llevó a cabo en un volumen de 50 µL que contenía 2 µL de cDNA de glándula digestiva (0,9 ng), 2 µL de cada cebador (Tabla 11) a una concentración de 10 µM, 1 µL de dNTPs mix 10 mM de cada dNTP, 5 µL de 10X *PCR Buffer*, 3,5 µL de MgCl₂ 50 mM (a una concentración final de 3,5 mM), 1U *Platinum[®]Taq DNA Polymerase* (0,2 µL) (Invitrogen, ref. 10966-026). El

programa utilizado fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C, 2 min; 35 ciclos x (94°C, 30 s; 52°C, 30 s; 72°C, 1 min) y un paso de extensión final de 72°C, 4 min. El tamaño esperado para el producto amplificado en esta reacción de PCR fue de 371 pb. El producto amplificado se separó en un gel de agarosa D1 (Pronadisa, ref. 8008) al 2% marcado con bromuro de etidio en concentración 0,5 µg/mL.

Para completar la secuencia del gen *abcg2* en mejillón se empleó la técnica de amplificación de los extremos 5' y 3' de cDNA (RACE). Se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del kit *SMARTer RACE cDNA Amplification* (Clontech, ref. 634923) tal como se ha indicado en el capítulo I (apartado 3.2.3 de materiales y métodos). Para completar la pauta abierta de lectura del gen fue necesario la síntesis de cDNA para la amplificación de los extremos 5' y 3'. Se realizaron dos reacciones, una para amplificar el extremo 5' y otra para el extremo 3'. El programa utilizado en las amplificaciones fue el siguiente: una desnaturalización inicial a 94°C, 2 min y a continuación 40 ciclos a 94°C, 5 s; 65°C, 10 s; 72°C, 2 min, terminando con un paso de extensión final a 72°C durante 4 min.

Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 11. Se diseñaron con el programa OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Los productos obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa marcado con bromuro de etidio.

Tabla 11. Relación de cebadores utilizados en la reacción de PCR y en la amplificación de los extremos 5' y 3' para el estudio del gen *abcg2* en *Mytilus galloprovincialis*.

Cebador	Finalidad	Orientación	Secuencia (5' - 3')	Amplicon (pb)
ABCG2 dF	RT-PCR amplificación	Sentido	GGATATGTDVTACARGATGAT	
ABCG2 dR	RT-PCR amplificación	Antisentido	GGYTGATGRATDGAGAAKATGA	371
ABCG2 Nested3 F	3' RACE PCR		CCAACAACCTGGCCTTGATGCCAACAC	1.443
ABCG2 Nested5 R	5' RACE PCR		GTCAGTCCACCCATAACAACATCATC	492

4.2.4.- Ligación, clonación y secuenciación.

Como se ha descrito en la sección de materiales y métodos del capítulo I (apartado 3.2.5) los productos obtenidos de la reacción de PCR y amplificación de extremos 5' y 3' se ligaron en el vector *pGEM[®]-T Easy* (Promega) utilizando el kit de clonación *pGEM[®]-T Easy Vector System* (Promega, ref. A1380). Tras la ligación, se transformaron células competentes de *E. coli* que se incubaron 2 horas a 37°C y después se sembraron en placas de medio LB suplementadas con ampicilina (Sigma, ref.

A9518), X-gal (Roche ref. 10745740001) e IPTG (Roche ref. 11411446001). Este medio permite la identificación de aquellas colonias que han incorporado el plásmido con el inserto. El inserto se detectó por PCR utilizando la pareja de cebadores M13F: GTTTTCCCAGTCACGAC y M13R: GTCATAGCTGTTTCCTG. Los clones positivos se prepararon para enviar a secuenciar en el servicio Secugen del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid) utilizando el kit *ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystem).

4.2.5.- Análisis de las secuencias.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se analizaron siguiendo las indicaciones descritas en el capítulo I (apartado 3.2.6 de materiales y métodos). Los cromatogramas se visualizaron con los programas FinchTV 1.4 y BioEdit *version 7.0.5.3* (Hall, 1999). Las secuencias finales se compararon con las existentes en la base de datos del EMBL-EBI utilizando el programa WU-blastp. Las secuencias nucleotídicas parciales se ensamblaron en el programa BioEdit con el programa CAP *Contig Assembly Program* (Huang, 1992). Con la secuencia final se hicieron y editaron los alineamientos para localizar las regiones conservadas en la proteína y se creó el árbol filogenético utilizando el método de máxima verosimilitud en el programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) en base a un valor de *Bootstrap* de 2.000 repeticiones.

4.3.- RESULTADOS.

4.3.1.- Clonación del cDNA que codifica para una proteína de la subfamilia ABCG y caracterización de dicha proteína.

Las secuencias obtenidas a partir de las reacciones de RT-PCR y RACE-PCR permitieron obtener la secuencia completa del cDNA que codifica para una proteína transportadora de la subfamilia ABCG, que posteriormente fue denominada ABCG2, en el tejido de la glándula digestiva de *M. galloprovincialis*.

La estrategia de clonación llevada a cabo para obtener la secuencia completa del gen *abcg2* se detalla en la Figura 30 así como las secuencias para cada fragmento especificadas en la Figura A3 del Anexo. La secuencia completa del gen *abcg2* se consiguió realizando una PCR para amplificar el fragmento inicial de 371 pb utilizando los cebadores ABCG2 dF/ABCG2 dR y secuenciando 7 clones. En sentido 3' la secuencia se completó con una única 3' RACE que amplificó un fragmento de 1.443 pb empleando el cebador ABCG2 Nested3 F, para la cual se secuenciaron 9 clones. La

secuencia en sentido 5' también se completó con una única amplificación por 5' RACE, consiguiendo un fragmento de 492 pb con el cebador ABCG2 Nested5 R a partir de la secuenciación de 6 clones.

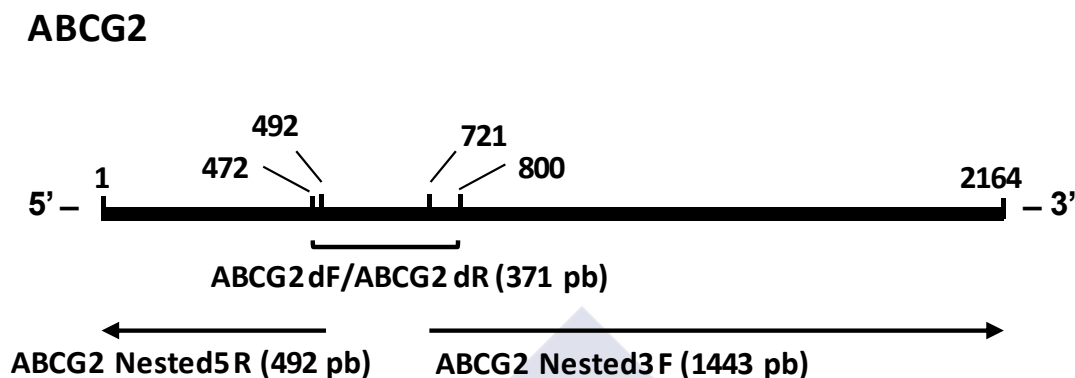


Figura 30. Estrategia de clonación para obtener la secuencia nucleotídica del gen *abcg2* de *Mytilus galloprovincialis*. Las líneas indican las posiciones de los fragmentos obtenidos por PCR o RACE.

La secuencia del cDNA del gen *abcg2* de *M. galloprovincialis* en la glándula digestiva está compuesta por 2.164 pb que codifican para una proteína de 635 aminoácidos. Esta proteína se denominó ABCG2 y fue enviada a la base de datos del EMBL *Nucleotide Sequence Database* (número de acceso HE599220). Las regiones 5' y 3'- no traducidas están formadas por 93 pb y 161 pb respectivamente. El peso molecular deducido de la proteína es de 70,95 kDa, sin tener en cuenta la glucosilación, y su punto isoeléctrico hipotético es de 8,03. En la proteína ABCG2 se localiza un posible sitio de N-glucosilación en la posición Asn⁵⁸⁰- Gly⁵⁸¹- Thr⁵⁸², que se corresponde con el segmento extracelular del extremo carboxi-terminal del dominio transmembrana. En la Figura 31 se muestra su secuencia en nucleótidos y la secuencia aminoacídica deducida.

El codón de iniciación de esta proteína está rodeado por los nucleótidos GgaATGt. La secuencia consenso de Kozak sólo presenta una de las dos posiciones críticas (la posición -3) para el inicio de la traducción. En este caso, la posición -3 se encuentra ocupada por una purina (la guanina) mientras que en la posición +4 aparece una timina.

La secuencia aminoacídica deducida de la proteína fue analizada con el programa *Conserved Domain Database CDD*. La organización estructural que mostró la proteína es la característica de los miembros de la subfamilia G de los transportadores ABC. A diferencia de otras proteínas ABC, los transportadores ABCG presentan dos

aspectos característicos en su organización estructural. Esta subfamilia está compuesta por *half-transporters* o semi-transportadores formados por un dominio de unión a nucleótido (NBD) en posición amino-terminal y seguido por un dominio transmembrana (TMD) en el extremo carboxilo. Dentro del NBD se localizaron los motivos conservados característicos de todas las proteínas ABC: Walker A, Walker B, motivo C y los A-, Q-, D- y H-loop (Figuras 31 y 32).

A

2 t g t t t a a a a g a g t t c a g a t g t c t a a c c a t t t t t a c c o t a g a c a a a c a c g c t c a g a a a a c t g t a t c a g t t t g t c a a a a c t g a t a t t a
92 g g a t g t c t t a a a c g a a t g g t g t t c c a a a c c c g g c g t a c a a c t a c g g g t c c a a a g a t g a a c a c t c c a a g t t g a c a t g g a a t c a a g t c a t
M S K T N G V P N P A Y N Y G S K D E H S K V D M E S S H
182 t a t g a a a g a g c t g c a a c g a t c a c t g g t c a t a a t a t c y n a c a g t g d a t g v a a a c a a a a c c a t g t t g t g g c a a a t g a g a a g a a g
Y E R A A A T I T G H N I V Y T V D K T K P C C G Q I E K K
272 g a a a t t a a a a g a a t c a a t g t a t t t c a a g c t g g t a t g a a t g c a t c c t t g g a c t g g a g t g t g a a a a t c t t c t g t a t t a g a t
E I L K G I N G I F K P G M N A I L G **G P T G S G K S S V L D**
362 a t a t t a g c g g g a a g a a a a g a c c c t g c t g g t t t a a g t g g a c a t c t c t t a c t g g a t g g a t c t c c a c c t c c t g a a a t t t a a g t g t a t g g t
I L A G R K D P A G L S G H L L D G S P P P E N F K C M V
452 g g a t a t g t g c a a g a t g a t g t t g t t a t g g g t g g a c t c a g a t c t g t g a a t t t g a t t c t c a g c a c t c r a l t a a g a t a c c a t g a t g a t
G Y V V Q D D V V M G G L T V R E N F E F S A T L R L P S D
542 g t c a a t a a g c t g a g a a a a g a c a g a t g a t a t g t t a a a t g a a c t g t g a a c a a a t g t c c g a t a c a a g t t g g a a t g a a
V T K A D R K D R V D N V I N E L G L N K C A D T K V G N E
632 t t t t c c g t g g t g t a t c t g g t g g a g a a g a a a a g a c a a t t a t g g t a t g g a t g t a t t a t c c c c t c c t g t g t a t t t t a g a t g a a
F F R G V S G E R K R T N I G M E L I I S P P V L F L D E
722 c a a c a a c t g g c c t g a t g c c a a c a c a g t c a a t t c t g a a t g a t t a t g a a g a a g a t g a t t a a a g a a g a c a g t t g t e t c t c c
P T **T G L D** A N T A N S V M M L L A L K G R a g t V **V F S**
812 a t c a c t c a g c c a a g a t a t t c t c c a a g t t a t t g a c a g t t a a t g c t g t a t c a t c a g g t g g a a t g t t t a t c a t g a c c a t g c c a g t
I H Q P R Y S I F K L F D S L M L S M G E C V Y H G P A S
902 g a a t c t t a g a g t a c t t c a a a t c t a t a g g a t a c g t t a t a g a a a c a c a a c c c a c a g a t t t t t t c t a g a t g t t a t t a a t g g a g
E S L E Y F F K S I G Y V I E E H N N P P D F F L D V I N G E
992 g c a a a t c a c t c a g a a a a g a c a t t g a a g a g t a c a t a c a a a t t g g t a t c a t c a t c a a g t c a a c t t a a a t c a a g a t t a c a a g t
A N H S E K D I E E V V H T K L V S S F Q K S T L N S R L Q S
1082 c a g a t g a a t c c t a t c t t a a c a g a t c a g c a t g c t g t a g a g c a a a c a a c t g t t a a g v t t t a c c a a a t a a a t g a c a a c a c a g t
Q M N P I L Q Q Y Q H A V E T N T V K V L P K I E Y A T S A
1172 t t c a c a g a t t t a g a g c t g t a t c t g c g a a c a a a c t t a a t t t g c t g a g a a a t c c a c a g c t g t c a g t a t a c a g a t g a t t a t t a g a t
F T Q Q F R A V S G R T I L L N L L R N P Q L S **V M O W L V L I**
1262 a t a t t t g a c t g a a t t t g a t g c t a t t a c t g c c a g c t a g a g a a g a t g b t g a a c g g a a t c c a a a c a g a t t g g a c c t t t t c t c
I F G L I V G A I Y W O L E K D C V T G I Q N R V G A F F F
1352 a t t a t a a g a a t c a a g t t t t g a a a t t a t c c g c a g a t a a t t g t t a t c a a a g a g a t c c a t a t c a t g c a t g a a a t g a g t g a g t g g a
I I M N Q V F G N L S A V E L F I K E R S I F M H E N V S G
1442 t t t t a c a g a g t g t c t c c t a c t t t t t c t c a a a t t a t c t g t a t g a t a c c a t a g a c t g a t t c c a g t a t t c t g t t t t c a a c t g c
F Y R V S A Y F F E S K I I C D V I P M R L I P V I L F S T V
1532 a c a t a t t t a t g t t g g g c t a c a g a t a g c a g a g a a c t t t t c c t a t g t c c t a t t g t t t a g a g c c a t c t c a t c a a g a
T Y F M L G L R L A A E N F F L Y V L S L F L V A M S A S G
1622 a t c c t f t t t t c t c a g t g c a c t g t g c c a a t t t t g c t g a c t a a c t g t a t t g a t t c c a c a t a t g t t t a t g a t t a g t a t t c a g t
I A F F F S A T V P I F A V A N L C I A L T Y V F M M V F S
1712 g g t t t a c t a g t a a a t g t a t c c t c t g t t c c a t a c t g g t t a c a t g g c t g a a a t g g g a a g c t t a t t a g a t a t g g t t t a a a c g a t t g a t
G L L V N V S S V P S W L R W L K W A S L F R Y G L N A L D
1802 a t a a t a g a g t g a a a g a c a t g a c c t t t t c c a a t g g c a c a g a c a c a t c g a g g a c t g g t a a t g a t a c c a t t a t g a c a g a c a t c c t
I N E L K D M T F S N G T A T C S G T G N D Y L I D Q N I P
1892 t a t c a a a c a a g c t g g g a t t t c t g c a a a t a t t g t t c a c t a g g g c a t g t c a g t a g t c c c a t g a c c g a t a c a t a c a t c a g c t g a g a
Y Q T S W D F W O N I V A L G A M S V I S M T G T Y I Q L R
1982 a g a t g a a g a a a t a a g a t a a g a t c t t a t a g a g a a a a c a g a t a g t g c a a g g a c a a a c c a t a t g t g t t c t t t t g g a a
R M K K L R *****
2072 a a a g a g t g t g a c c c t t t a a a g t g t t g g g g t t a g c t a t c a a g g a a c c t a c g c t a t t t t t g a g a t t t t t t t t t t t t t g g c t a g t a g
ctg 2164

Figura 31. Secuencia nucleotídica de *abcg2* (A) y secuencia aminoacídica deducida de la proteína resultante (A y B) de *Mytilus galloprovincialis*. Los codones de inicio y fin están enmarcados en un rectángulo. El dominio transmembrana (TMD) se indica en negrita y las hélices transmembrana aparecen subrayadas. El dominio de unión al nucleótido (NBD) que contienen los motivos conservados: Walker A/P-loop, Q-loop, Motivo C, Walker B, D-loop, H-loop/Switch region aparecen marcados. El sitio de N-glucosilación está sombreado en gris.

B

MSKTNGVNPAYNYGSKDEHSKVDMESSHYERAATITGHNIVYTVDVKTKPCCGQIEKKEILKGINGIFKPGMNAIL**LPTGSG**
KSSVLDILAGRKDPAGLSGHLLEDGSPPEFNCVMVG**VVVQ**DDVVMGGLTVRENFESATLRLPSDVTKADRKDRVDNVINEL
 GLNKCADTKVGNEFFRG**VSGGERKRTN**IGMELIISP**PVLFLE**PT**TGLD**ANTANSVMMLLRRLALKGR**TVFSIHQP**RY**SIFK**
 LFDSLMLLSMGECVYHGPA**SE**LEYFKSIGYVIEEHNPPDFFLDVINGEANHSEKDIEEVHTKLVS**SFQKSTLNSRLQ**SQMN
 PILQQYQHAVETNTVKVLPKIEYATSAFTQFRAVSGRTILNLLRN**PQLS****VMQWLVLII****FGLIVGAIYWQLEKDCVTGIQNRVG**
AFFFIIMNQVFGNLSA**VELFIKERSIF**MHENVSGFYRV**SAYFFSKIICDVIPMRLIPVILFSTVTYF**MLGLRLAAEN**FFLYVL**
SLFLVAMSASGIAFFFSATVPIFAVANLCIALTYVFMMVFSGLLVNVSSVPSWLRWLKWASLFRYGLNALDINELKDMTFSNG
TATCSGTGNDYLIDQNIPYQTSWDFWQNIVALGAMSVISMTGT**YIQLRRMKKLR***

Figura 31 (continuación)

El servidor Polyphobius permitió predecir la estructura de la proteína de membrana. El programa identificó 6 segmentos transmembrana (α -hélices) dentro del único dominio transmembrana que presenta la proteína. Los extremos amino-terminal y carboxi-terminal se localizan intracelularmente (Figuras 31 y 32).

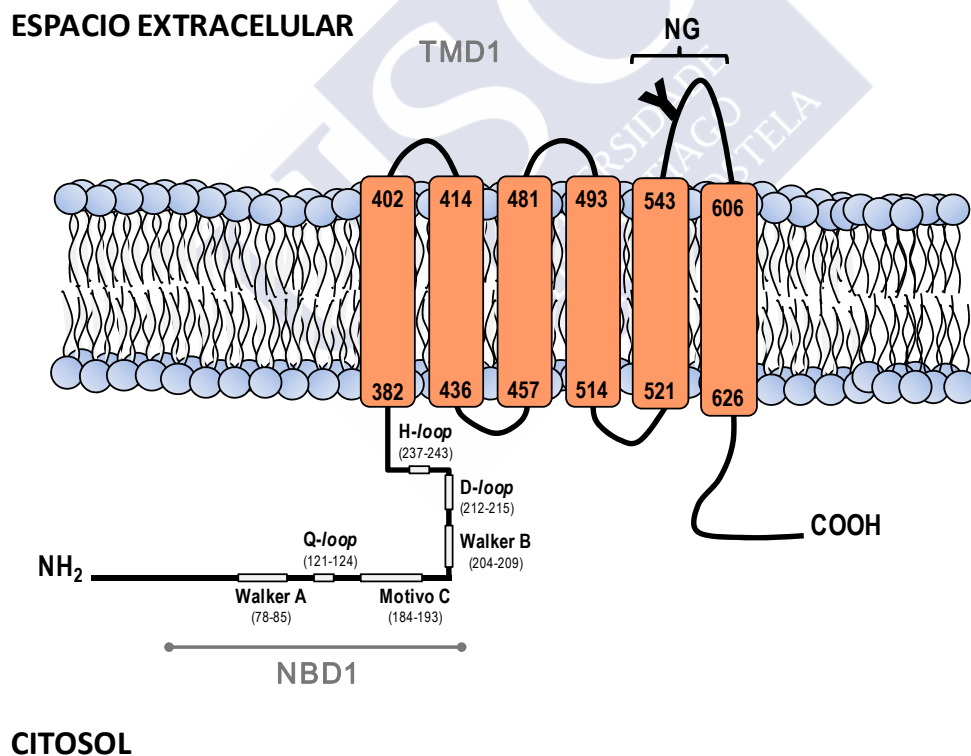


Figura 32. Topología de la proteína ABCG2 de *Mytilus galloprovincialis* con el dominio de unión a nucleótido (NBD) predicho por programa CDD que contiene los motivos altamente conservados de los transportadores ABC y el dominio transmembrana (TMD) empleando el algoritmo Polyphobius. El posible sitio de N-glucosilación (NG) de la proteína aparece marcado.

La secuencia aminoacídica de la proteína ABCG2 se comparó con secuencias almacenadas en las bases de datos con el programa WU-blastp. El análisis reveló que la secuencia de mejillón muestra una gran similitud con otras proteínas ABCG de bivalvos y vertebrados, lo que confirmó su identidad como transportador ABC de la subfamilia ABCG. Una búsqueda de similitud en la base de datos UNIPROT (WU-blastp) mostró 65% de identidad con *Crassostrea gigas* Abcg2, 33-27% de identidad con *Crassostrea gigas* Abcg1, Abcg5 y Abcg8; 55% de identidad con *Strongylocentrotus purpuratus* Abcg2a y 52% de identidad con *Homo sapiens* ABCG2 (Tabla 12).

Tabla 12. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína ABCG2 de *Mytilus galloprovincialis* con proteínas de la familia ABCG en otras especies.

Especie	Núm. Acceso	Phylum	Descripción	Identidad con ABCG2 (%)
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC30984	Mollusca	Abcg1	27
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC19658	Mollusca	Abcg2	65
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC40938	Mollusca	Abcg5	30
<i>Crassostrea gigas</i>	EKC40937	Mollusca	Abcg8	33
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	AFH89643	Echinodermata	Abcg2a	55
<i>Danio rerio</i>	ABB46490	Chordata	Abcg2a	54
<i>Danio rerio</i>	CAM13033	Chordata	Abcg2b	49
<i>Danio rerio</i>	CAX13044	Chordata	Abcg2c	50
<i>Danio rerio</i>	CAX12369	Chordata	Abcg2d	48
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	ABW05101	Chordata	Abcg2	52
<i>Salmo salar</i>	ACN10892	Chordata	Abcg2	51
<i>Xenopus tropicalis</i>	Q28BS4	Chordata	Abcg2	51
<i>Homo sapiens</i>	Q9UNQ0	Chordata	ABCG2	52
<i>Mus musculus</i>	Q7TMS5	Chordata	Abcg2	51
<i>Rattus norvegicus</i>	Q80W57	Chordata	Abcg2	51

La secuencia aminoacídica de la proteína ABCG2 de mejillón se alineó con otras proteínas ABCG de vertebrados e invertebrados presentes en las bases de datos del EMBL-EBI y, se editaron con el programa GeneDoc v.2.7 para valorar las zonas conservadas dentro de la proteína (Figura 33).

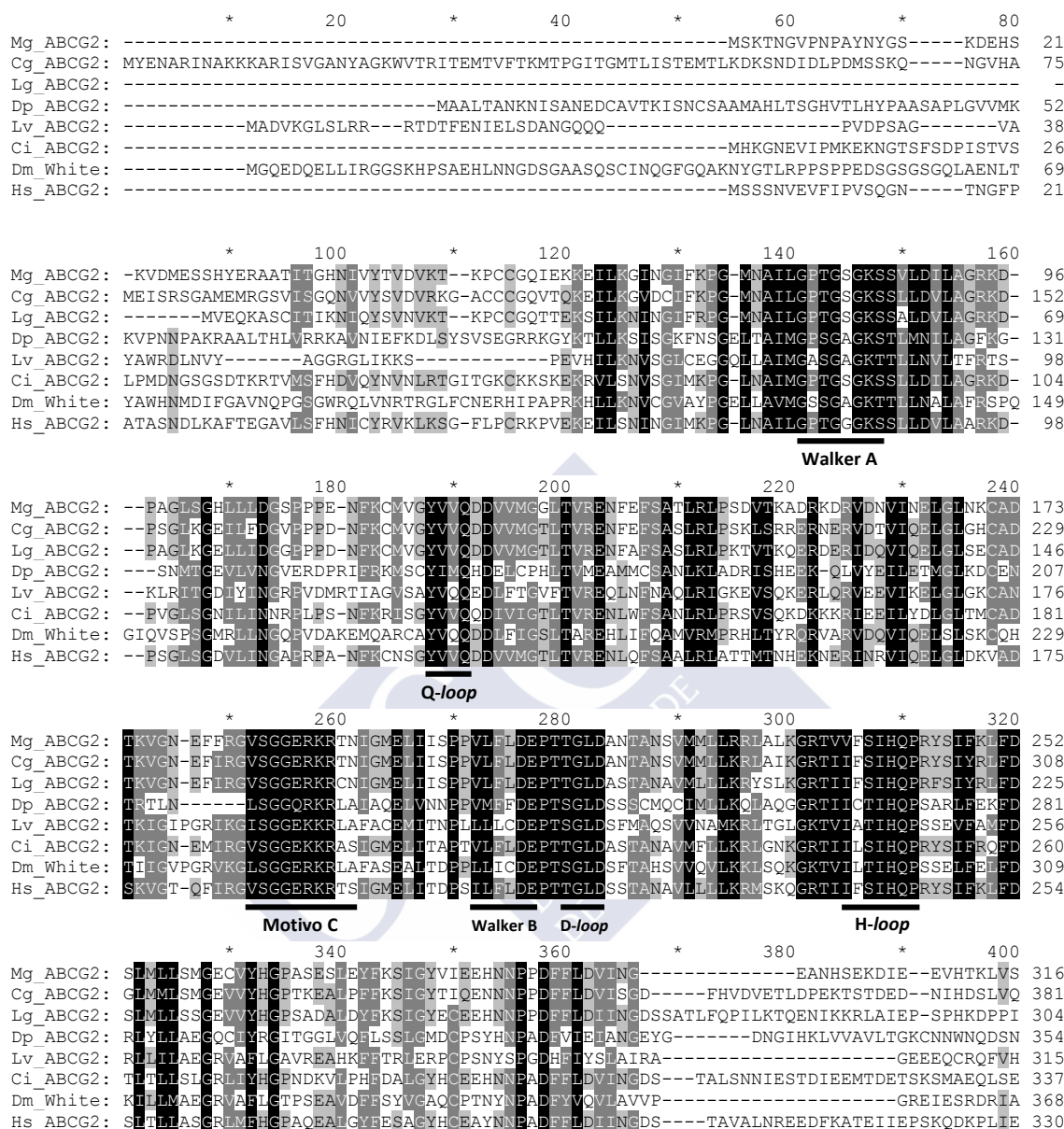


Figura 33. Alineamiento de la proteína ABCG2 de *Mytilus galloprovincialis* con diferentes proteínas ABCG de otras especies. Las regiones conservadas aparecen sombreadas (negro, 100%; gris oscuro, 80%; y gris claro, 60%). Mg_ABCG2: *Mytilus galloprovincialis* ABCG2 (CCD42044); Cg_ABCG2: *Crassostrea gigas* ABCG2 (EKC19623); Lg_ABCG2: *Lottia gigantea* ABCG (protein ID: 141832); Dp_ABCG2: *Daphnia pulex* ABCG2 (protein ID: 347444); Lv_ABCG2: *Litopenaeus vannamei* ABCG2 (ACN30234); Ci_ABCG2: *Ciona intestinalis* ABCG (XP_002123811); Dm_White: *Drosophila melanogaster* (AAF45826); Hs_ABCG2: *Homo sapiens* ABCG2 (NP_004818).

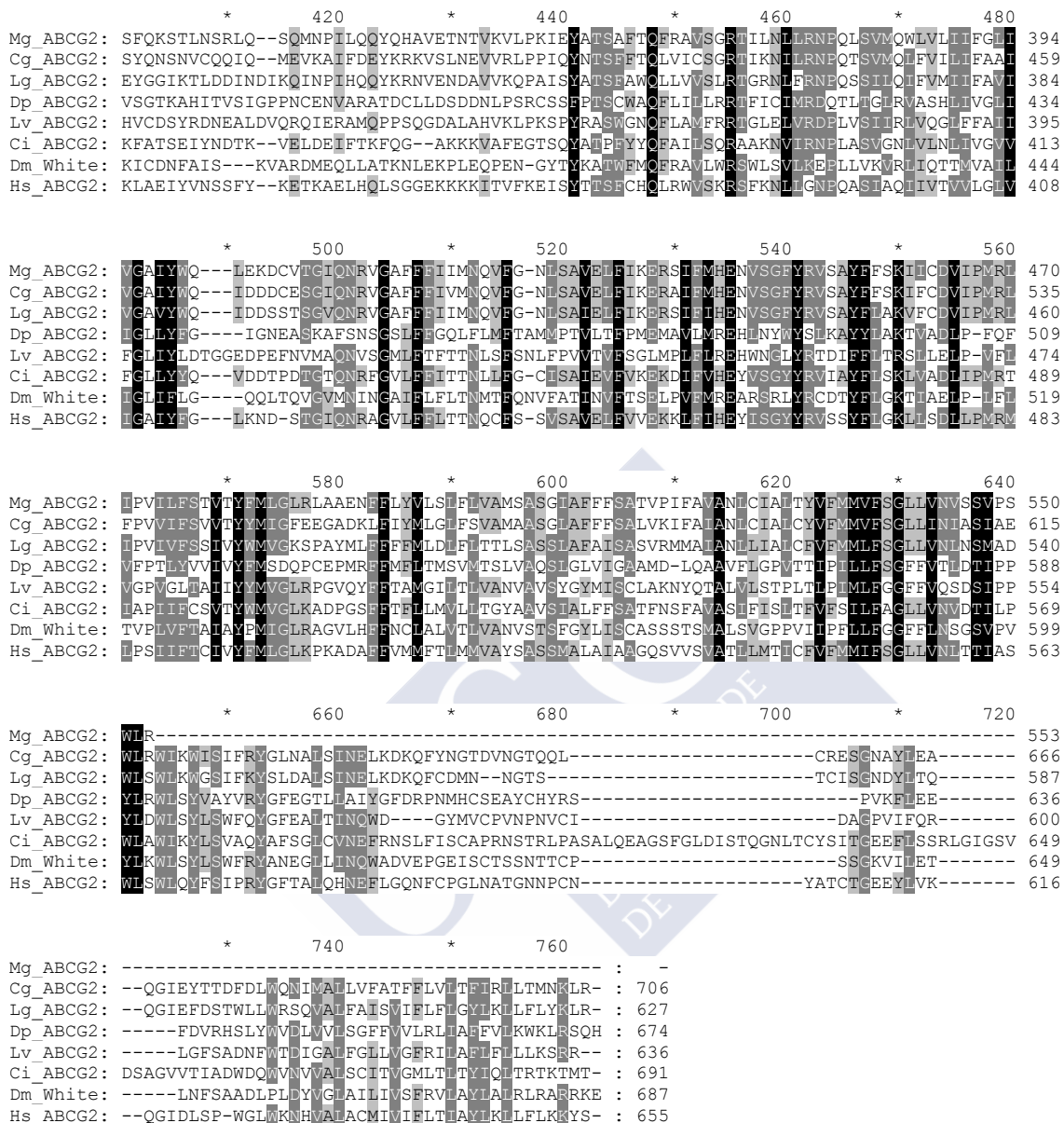


Figura 33 (continuación)

4.3.2.- Análisis filogenético.

La relación filogenética entre la proteína ABCG2 detectada en mejillón y otras proteínas de la subfamilia ABCG de vertebrados e invertebrados marinos depositadas en las bases de datos se realizó con el método de máxima verosimilitud utilizando el programa MEGA 5.05. La bondad de los agrupamientos se determinó analizando 2.000 posibles agrupamientos. El árbol filogenético resultante mostró que la proteína ABCG2 de mejillón es más similar a la ABCG2 de humanos que a otras ABCG de humanos (Figura 34).

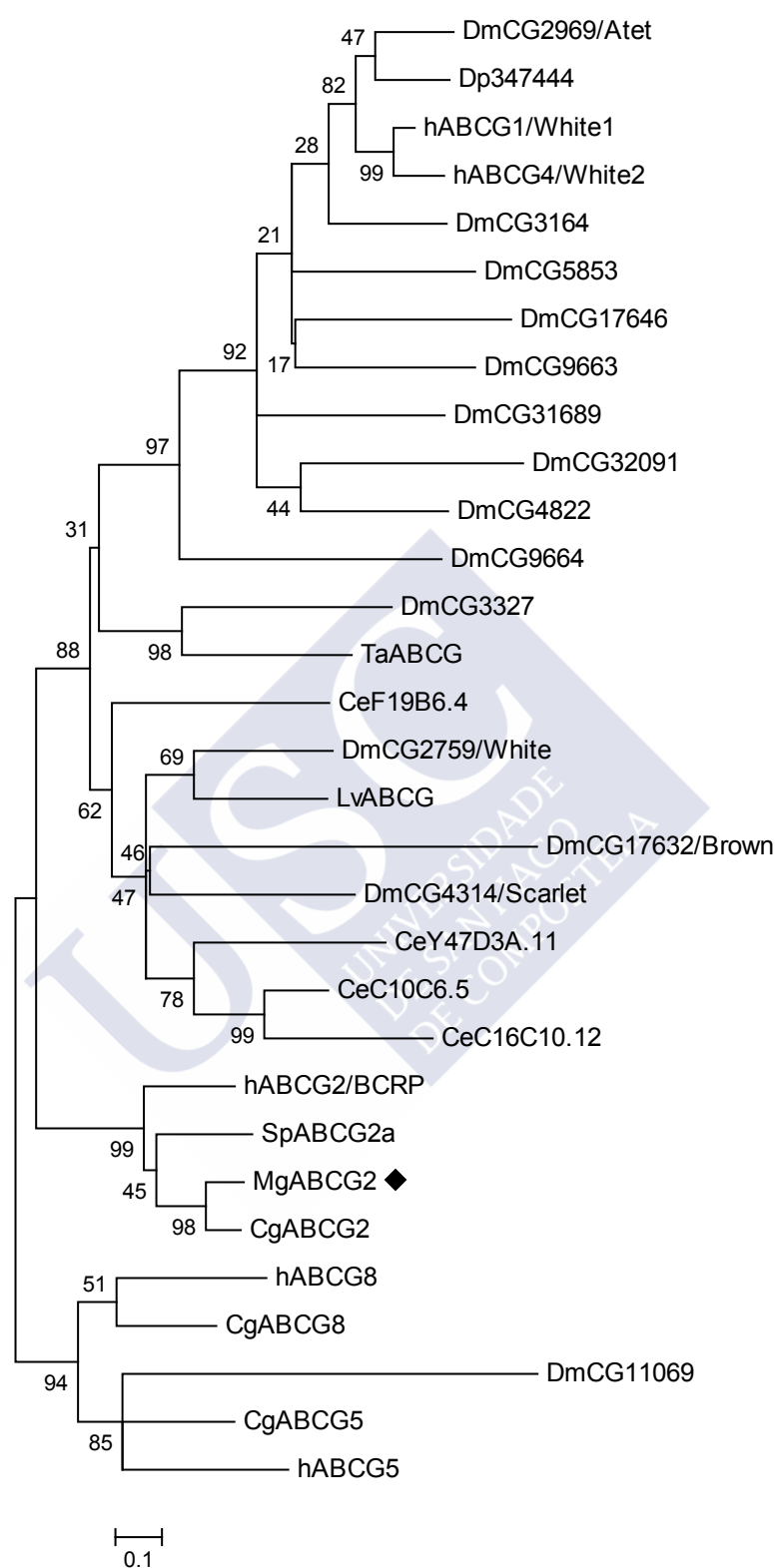


Figura 34

Figura 34. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de la proteína ABCG2 obtenida en *Mytilus galloprovincialis* y proteínas ABCG de otros invertebrados. La historia evolutiva fue inferida por el método de máxima verosimilitud basado en el modelo matricial Jones-Taylor-Thornton (Jones *et al.*, 1992). El árbol consenso (*bootstrap consensus tree*) inferido a partir de 2.000 repeticiones se tomó para representar la historia evolutiva de los taxones analizados (Felsenstein, 1985). El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtiene automáticamente de la siguiente manera. Cuando el número de sitios comunes era <100 o menos de la cuarta parte del número total, se utilizó el método de máxima parsimonia, de lo contrario se utilizó el método BIONJ con la matriz de distancia MCL. Se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias evolutivas entre los tipos de sitios (8 categorías (+ G, parámetro = 1,6179)). El alineamiento de las secuencias fue construido con el ClustalW 2.0.3 y el análisis filogenético se llevó a cabo en MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). La secuencia MgABCG2 está marcada con un rombo negro. Los transportadores ABCG son los siguiente: *ATP-binding cassette sub-family G* CeC10C6.5 (CAB05682), CeC16C10.12 (CAA86750), CeF19B6.4 (CAA93461) y CeY47D3A.11 (CAB57891) para *Caenorhabditis elegans*; *ATP-binding cassette sub-family G* DmCG2969/Atet (AAF51027), DmCG17632/Brown (AAF47020), DmCG11069 (AAF56361), DmCG17646 (AAF51341), DmCG3164 (AAF51548), DmCG31689 (NP_722827), DmCG32091 (NP_729728), DmCG3327 (AAF51122), DmCG4822 (AAF51552), DmCG5853 (AAO41181), DmCG9663 (AAF51130), DmCG9664 (AAF451131), DmCG4314/Scarlet (AAF49455) y DmCG2759/White (AAF45826) para *Drosophila melanogaster*; *ABC Transporters* hABCG1/WHITE1 (AAC51098), hABCG2/BCRP (XP_032425), hABCG4/WHITE2 (NP_071452), hABCG5 (AF320293) y hABCG8 (AF320294) para *Homo sapiens*; *ABCG transporters* Dp347444 (protein ID 115326) para *Daphnia pulex*; CgABCG2 (EKC19658), CgABCG5 (EKC40938) y CgABCG8 (EKC40937) para *Crassostrea gigas*; SpABCG2a (AFH89643) de *Strongylocentrotus purpuratus*; LvABCG (ACN30234) de *Litopenaeus vannamei*, TaABCG (XP_002113338) de *Trichoplax adhaerens* y MgABCG2 (HE599220) de *Mytilus galloprovincialis*. Protein ID de las secuencias utilizadas para el análisis están disponibles en el portal de JGI genome <http://www.jgi.doe.gov/Daphnia>.

4.4.- DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en este capítulo surgen del empleo de diferentes técnicas moleculares para identificar, clonar y caracterizar una nueva proteína ABC en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*. El gen *abcg2* comparte características estructurales distintivas de la familia de proteínas ABCG que están ausentes en otros miembros de la superfamilia de transportadores ABC.

La proteína ABCG2 de mejillón presenta la topología característica de esta subfamilia. Está compuesta por un NBD y un TMD con una configuración inversa al resto de los transportadores ABC donde el NBD se localiza en el extremo amino-terminal y el TMD en el extremo carboxi-terminal. En el NBD están presentes los motivos conservados característicos Walker A, Walker B y motivo C, además de los

otros motivos como el A-loop, Q-loop, D-loop y H-loop (Ambudkar *et al.*, 2006). El núcleo conservado del motivo C (LSGGQ) y los residuos de Arg (R) y Ser (S) en las posiciones 8 y 10 respectivamente, sufren pequeñas variaciones en esta proteína. En *M. galloprovincialis* el núcleo varía con respecto a la secuencia consenso general a VSGGE, pero no varía en relación con la secuencia que presentan las proteínas de la subfamilia ABCG, y sólo el residuo 10 está sustituido por Asn (N) mientras que la posición 8 mantiene la Arg (R). El núcleo conservado del motivo C de la proteína ABCG2 de mejillón coincide con el de la proteína ABCG2 en humanos: VSGGE. El motivo A-loop se sitúa aproximadamente 25 aminoácidos antes del Walker A y contiene un residuo aromático. Este residuo en la subfamilia ABCG puede ser triptófano (Trp, W): en ABCG1, ABCG4, ABCG5 y ABCG8 o bien fenilalanina (Phe, F) en ABCG2 (Ambudkar *et al.*, 2006). En mejillón no se ha encontrado ningún residuo aromático que cumpla la pauta de localización entre 23-27 aminoácidos antes del Walker A.

Esta subfamilia de semi-transportadores necesita formar dímeros para ser funcional. Diferentes estudios han reconocido el papel del segmento extracelular entre el TM5 y TM6 en la actividad oligomérica (Kage *et al.*, 2002, 2005; Henriksen *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008; Mo *et al.*, 2012). Este segmento, que es más largo en la proteína ABCG2 de humanos, está formado por 72 aminoácidos y contiene tres residuos de cisteína implicados en la formación de enlaces de disulfuro (592, 603 y 608). En concreto, Cys⁶⁰³ forma un enlace disulfuro intermolecular mientras que Cys⁵⁹² y Cys⁶⁰⁸ forman un enlace disulfuro intramolecular. En mejillón este segmento está formado por 62 aminoácidos y solamente contiene un residuo de Cys⁵⁸⁵ (C), de manera que, este residuo podría estar implicado en la formación del enlace disulfuro intermolecular. Otro motivo implicado en el proceso de dimerización es GXXXG que en mejillón también se localiza en el TM1. Los residuos básicos y polares son esenciales para determinar la especificidad por el sustrato. Su papel ha sido estudiado por diferentes autores en varios transportadores ABC (Taguchi *et al.*, 1997; Ryu *et al.*, 2000; Conseil *et al.*, 2006). Ni *et al.* (2010a) y Cai *et al.* (2010) identificaron varios residuos polares y básicos dentro o cerca del TM1 y TM2 respectivamente, que estaban implicados en las interacciones entre el sustrato y el transportador ABCG2. Al alinear la secuencia proteica ABCG2 humana con la de mejillón se observa que en la mayoría de los casos esas mismas posiciones en *M. galloprovincialis* están ocupadas por residuos polares o básicos, excepto la posición Thr⁴⁰² que en mejillón presenta un aminoácido no polar: Leu³⁸⁸ y el residuo básico Lys⁴⁵³ que contiene un aminoácido neutro: Ser⁴⁴⁰.

La presencia de la proteína ABCG2 ha sido caracterizada en los últimos años en diferentes especies desde la bacteria Gram-positiva *Lactococcus lactis* (Janvilisri *et al.*,

2003) o en la levadura *Pichia pastoris* (Mao *et al.*, 2004) hasta en humanos. En invertebrados se han identificado ocho miembros en el genoma de *Ciona intestinalis* (Annilo *et al.*, 2006), de ellos, cuatro presentan un porcentaje de identidad entre el 38-50% con la proteína humana ABCG2. En 2009, en los crustáceos *Litopenaeus vannamei* y *Daphnia pulex* fueron clonados e identificados algunos miembros pertenecientes a esta subfamilia. En *Litopenaeus vannamei* se obtuvo la secuencia completa del transportador ABCG2 a partir de hepatopáncreas (Zhou *et al.*, 2009). Mientras que Sturm *et al.* (2009) identificaron en el genoma del crustáceo *Daphnia pulex* 23 transportadores ABCG. El elevado número de genes presentes en este crustáceo y también en *Drosophila* se debe a la duplicación de los genes. Los genomas de insectos y nemátodos presentan un gran número de genes duplicados, siendo más elevado los genes en tándem o localmente duplicados en *Caenorhabditis elegans* que en *Drosophila*. Una situación similar es la que presenta los transportadores ABCG en *Daphnia pulex*. Goldstone *et al.* (2006) estudiaron las familias de genes implicadas en la protección frente a sustancias químicas de estrés en el erizo *Strongylocentrotus purpuratus*. Se identificaron 65 genes pertenecientes a las ocho subfamilias ABC, un total de nueve genes pertenecen la subfamilia ABCG de los cuales cuatro son *Abcg2*. Actualmente Gökirmak *et al.* (2012) han obtenido la secuencia completa del gen *abcg2* en embriones de *Strongylocentrotus purpuratus*. En erizo se obtuvieron nueve miembros pertenecientes a la subfamilia ABCG, de los cuales, cuatro pertenecen a ABCG2. En insectos también se han identificado el gen *abcg2*. En el mosquito del trigo, *Mayetiola destructor*, Shukle *et al.* (2008) evaluaron el patrón espacial (en los diferentes tejidos) y el patrón temporal (durante el desarrollo) de la proteína ABCG2. En vertebrados se han identificado varios genes transportadores ABCG en los últimos años. En la rana *Xenopus laevis* se detectó la expresión del gen *abcg2* en ovocitos (Nakanishi *et al.*, 2003). En varios peces teleósteos como *Oncorhynchus mykiss*, *Danio rerio*, *Salmo salar* y *Chelon labrosus* también se han clonado y caracterizado genes que codifican para la proteína ABCG2. Annilo *et al.* (2006) obtuvieron a partir del genoma de *Danio rerio* cuatro copias parálogas del gen *abcg2*. En el hígado de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, se caracterizó el gen *abcg2* (Zaja *et al.*, 2008b). En 2012, de Cerio *et al.* caracterizaron un fragmento parcial que codifican para el gen *abcg2* en *Chelon labrosus* (de Cerio *et al.*, 2012). Leong *et al.* (2010) identificaron en el salmón atlántico (*Salmo salar*) un pequeño fragmento de 432 aminoácidos (datos no publicados).

Los análisis filogenéticos revelaron un alto grado de similitud de la proteína con la ABCG2 de humanos y de invertebrados, concretamente este miembro de la subfamilia ABCG está implicado en el transporte de xenobióticos desempeñando un papel importante en la multirresistencia frente a xenobióticos (MXR) (Ozvegy *et al.*,

2002). En resumen, los resultados obtenidos en este capítulo caracterizan, por primera vez, la secuencia completa del cDNA que codifica para una proteína de membrana ABCG2 en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*.







5. CAPÍTULO III:

**Expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2*
en *Mytilus galloprovincialis***



5.1.- INTRODUCCIÓN.

El sistema de multirresistencia frente a xenobióticos (MXR) (Kurelec, 1992), análogo a la multirresistencia frente a fármacos (MDR) en células tumorales, presente en organismos acuáticos funciona como un mecanismo de defensa que los protege frente a los xenobióticos (Bard, 2000).

Las causas de que una célula tumoral sea resistente a la quimioterapia son muchas y de distinta naturaleza. Entre los factores que causan esta resistencia están las proteínas transportadoras de membrana pertenecientes a la superfamilia ABC. Este fenómeno recibe el nombre de resistencia múltiple frente a fármacos o MDR. La mayoría de las células tumorales presentan una resistencia innata a los xenobióticos mientras que otras la han adquirido tras el contacto con los fármacos. El mecanismo de resistencia frente a fármacos se puede resumir en seis clases: (1) disminución/pérdida/alteración de la diana del fármaco; (2) aumento del metabolismo del fármaco; (3) aumento de los mecanismos de reparación celular; (4) disminución de la absorción de fármacos; (5) aumento de la expulsión del fármaco y (6) compartimentación del fármaco. Las células adaptadas a los tres primeros mecanismos son, a menudo, resistentes a un grupo de fármacos similares en estructura y función. Por el contrario, los tres últimos mecanismos alteran la acumulación de los fármacos dentro de la célula lo que implica la resistencia a varios fármacos estructural y funcionalmente diferentes lo que se conoce como MDR (Ambudkar *et al.*, 1999).

La historia de las proteínas relacionadas con la resistencia múltiple frente a fármacos comienza en 1973 cuando Dano *et al.* descubren la expulsión de daunomicina en células tumorales resistentes. Las células expuestas a este fármaco desarrollaban resistencia a otros compuestos estructuralmente diferentes. En 1976, Juliano y Ling descubrieron una glucoproteína en la membrana plasmática de células multirresistentes llamada P-gp (Juliano y Ling, 1976). Pero es en 1983, cuando el equipo de Ling dio a conocer que el aumento de la expresión de P-gp estaba implicado en la resistencia múltiple frente a fármacos en líneas celulares de mamíferos (Kartner *et al.*, 1983). La secuencia completa de la proteína MDR se obtiene un par de años después, en 1986 por Chen *et al.*. En 1992, Cole *et al.* identifican un nuevo transportador ABC, la MRP1, a partir de una línea celular de cáncer de pulmón multirresistente que no expresaba P-gp (Cole *et al.*, 1992). Otra proteína causante del fenotipo MDR es la ABCG2 aislada en líneas celulares multirresistente seleccionadas por exposición a mitoxantrona (Chen *et al.*, 1996; Savary *et al.*, 1996; Croop *et al.*, 1997).

Además de la P-gp (ABCB1), MRP1 (ABCC1) y ABCG2, al menos doce transportadores ABC están relacionados o pueden producir una disminución de la acumulación intracelular del fármaco. Estos transportadores ABC han sido estudiados por varios grupos: ABCA2 (Vulevic *et al.*, 2001), ABCA3 (Chapuy *et al.*, 2008), ABCB4 (Smith *et al.*, 2000), ABCB5 (Frank *et al.*, 2005), ABCB11 (Childs *et al.*, 1998), ABCC2 (Huisman *et al.*, 2005), ABCC3 (Zelcer *et al.*, 2001), ABCC4, ABCC5 (Ritter *et al.*, 2005), ABCC6 (Belinsky *et al.*, 2002), ABCC10 (Hopper-Borge *et al.*, 2004) y ABCC11 (Chen *et al.*, 2005).

Muchos organismos acuáticos son capaces de sobrevivir en ambientes que contienen altos niveles de toxinas de origen natural o múltiples contaminantes debidos a la actividad humana gracias al mecanismo denominado multirresistencia frente a xenobióticos (MXR) (Kurelec, 1992). La biotransformación y eliminación (o desintoxicación) del xenobiótico tiene lugar en varias fases en las que participan una serie de sistemas enzimáticos:

- Fase I: funcionalización.
- Fase II: conjugación.
- Fase III/0: transporte activo (Proteínas transportadoras ABC).

El objetivo principal de las dos primeras fases es disminuir la toxicidad del xenobiótico transformándolo en un derivado más hidrófilo que facilite su excreción. En la Fase I actúan principalmente dos grupos de enzimas, las oxidorreductasas y las hidrolasas que se encargan de modificar químicamente los compuestos para que sean más hidrófilos y por tanto, más fácilmente eliminables en fases posteriores. Suele tener lugar a nivel microsomal (retículo endoplasmático) y se llevan a cabo procesos de hidrólisis, oxidación y reducción. Las enzimas de la superfamilia Citocromo P450 (CYP) son las que predominan en la Fase I del metabolismo de los xenobióticos aunque también actúan otras como las monooxigenasas dependientes de flavina (FMO), las monoaminoxidasas (MAO), las ciclooxigenasas, las deshidrogenasas, las reductasas, las esterasas y las amidasas. La Fase II ocurre generalmente en el citosol y las enzimas de esta fase (transferasas) aprovechan grupos electrofílicos presentes originalmente en la molécula sustrato o bien, introducidos por las enzimas de Fase I, para llevar a cabo reacciones de conjugación con moléculas de bajo peso molecular, como glutatión, ácido glucurónico o acetyl coenzima A, etc. La última fase del mecanismo de biotransformación de los xenobióticos se caracteriza por la acción de los transportadores del sistema de multirresistencia frente a xenobióticos. Los transportadores ABC bombean los metabolitos conjugados fuera de la célula, de ese modo, la concentración

intracelular de los xenobióticos disminuye. Sin embargo, estos transportadores pueden actuar en una primera línea de defensa denominada Fase 0 previniendo la acumulación intracelular de toxinas por unión y excreción directa de xenobióticos y contaminantes (Liska, 1998; Oesch y Arand, 1999; Xu *et al.*, 2005) (Figura 35).

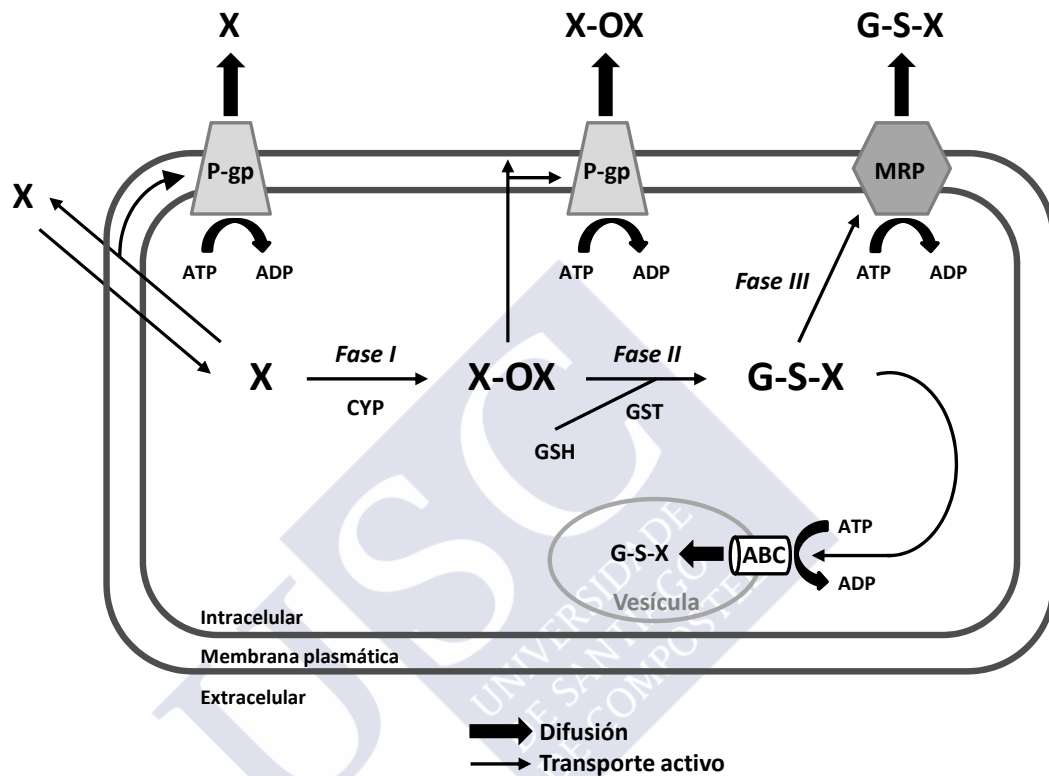


Figura 35. Modelo del proceso de desintoxicación de xenobióticos. Un tóxico (X) en bajas concentraciones puede eliminarse por difusión desde el interior al exterior de la célula o por unión y excreción directa a través de transportadores ABC (P-gp). A altas concentraciones, el tóxico X se acumula y es metabolizado por enzimas de la familia Citocromo P450 (CYP450), los metabolitos resultantes pueden eliminarse directamente a través de la P-gp o conjugarse con el glutatión para ser expulsados por transporte activo de MRP o secuestrados en vesículas citoplasmáticas (Modificado de Bard, 2000).

La reducción en la acumulación intracelular de los xenobióticos se debe a la expulsión a través de la membrana celular por los transportadores ABC aunque también puede producirse por el secuestro de los compuestos en vesículas citoplasmáticas. El papel que desempeñan los transportadores en el secuestro vesicular de compuestos ha sido estudiado por Svensson *et al.* (2003). Su estudio confirmó que los transportadores pueden acumular grandes cantidades de compuestos tóxicos dentro de compartimentos

citoplasmáticos en vesículas endocíticas, es decir, secuestran los compuestos en lugar de excretarlos (Svensson *et al.*, 2003).

El mecanismo de desintoxicación de xenobióticos está presente en todos los organismos. Su funcionamiento se ha detectado en numerosas especies acuáticas como esponjas, crustáceos, mejillones, ostras, almejas, estrellas de mar, erizos de mar, corales y peces (Bard, 2000; Hamdoun *et al.*, 2004; Roepke *et al.*, 2006; Venn *et al.*, 2009). La mayoría de los estudios se han centrado principalmente en el metabolismo y transporte de compuestos antropogénicos aunque existen ciertos sustratos procedentes de organismos marinos que también pueden inducir el sistema MXR. Entre los sustratos naturales se incluyen los lamellarinos, un grupo de compuestos aromáticos condensados policíclicos, aislados de tunicados del género *Didemnum* (Quesada *et al.*, 1996; Vanhuyse *et al.*, 2005); la patellamida D un octapéptido cíclico obtenido del tunicado *Lissoclinum patella* (Williams y Jacobs, 1993); las botrillamidas, una bomotirosina derivada de la ascidia *Botryllus tyreus* (Henrich *et al.*, 2009); el dolostatin, un péptido lineal derivativo aislado de la liebre de mar *Dolabella auricularia* (Aherne *et al.*, 1996); el sifolenol A, un triterpeno sifolano obtenido de la esponja *Callyspongia siphonella* (Shi *et al.*, 2007); la hippurina, esteroides con estructura polioxigenada, obtenidos de la gorgonia *Isis hippuris* (Tanaka *et al.*, 2002); el alcaloide caulerpina, encontrado en algas del género *Caulerpa* (Schröder *et al.*, 1998); la caliculina A, un inhibidor de las proteínas fosfatasa PP1 y PP2A aislada del género de algas verdes *Acetabularia* (Chambers *et al.*, 1993); y toxinas marinas como el ácido okadaico producidas por dinoflagelados del género *Dinophysis* y *Prorocentrum* (Suganuma *et al.*, 1988; Chambers *et al.*, 1993; Mouratidou *et al.*, 2006). La distribución de los transportadores del sistema MXR en tejidos implicados en la absorción, secreción y función de barrera en organismos acuáticos sugiere que pueden desempeñar un papel en la protección frente a los xenobióticos presentes en la dieta. Hasta el momento, se desconoce si el sistema MXR juega algún papel en la eliminación de toxinas marinas durante los procesos de desintoxicación celular en moluscos afectados por toxinas.

Con el fin de encontrar evidencias que apoyen la hipótesis de que la presencia de toxinas (principalmente toxinas diarreicas DSP) induce la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* durante un episodio producido por *Dinophysis acuminata*, se cuantificaran por medio de RT-qPCR en tiempo real los niveles de mRNA de los tres genes en mejillones libres y afectados por la toxina DSP. Los análisis de expresión génica basados en la técnica de RT-qPCR emplean genes de referencia para normalizar los resultados, en este sentido, en este capítulo también se analizará la estabilidad de varios genes en diferentes tejidos de mejillón con el fin de encontrar los mejores genes de referencia para normalizar los datos en cada situación.

5.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.

5.2.1.- Obtención de los animales.

En los estudios de expresión se emplearon muestras de mejillón (*Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819) obtenidas durante los muestreos semanales del INTECMAR (Instituto Tecnológico para el Control do Medio Mariño, Xunta de Galicia, <http://www.intecmar.org/>).

Durante el año 2010 tuvo lugar un fuerte episodio tóxico por biotoxina DSP causado por *Dinophysis acuminata* que ocasionó la prohibición de extracción de moluscos en las rías gallegas. La prohibición se mantuvo desde finales del mes de junio hasta mediados de noviembre de ese mismo año en la ría de Pontevedra. En la ría de Arousa, ese episodio provocó el cierre de los polígonos durante 15 días en el mes de julio, posteriormente se produjo un levantamiento de la prohibición comenzando a detectarse un nuevo aumento de la toxicidad en el mes de septiembre que mantuvo el cierre de los polígonos hasta el mes de octubre (Tabla 13). En septiembre de 2009 se tomó una muestra en la ría de Arousa (Pobra B), y entre julio y septiembre de 2010 se tomaron muestras en una estación de la ría de Arousa (Grove A) y en dos estaciones de la ría de Pontevedra (Bueu A2 y Bueu B) (Figura 36). En las estaciones Grove A, Bueu A2 y Bueu B se recogieron muestras a 1, 5 y 10 metros de profundidad.

Tabla 13. Diagrama de Mareas Rojas en cultivos de viveros flotantes en las rías gallegas durante el año 2010. Datos facilitados por el INTECMAR.

	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
Ría de Pontevedra												
Bueu B												
Bueu A2												
Ría de Arousa												
Grove A												

Las muestras correspondientes al periodo de julio-septiembre de 2010 fueron tomadas durante un episodio de presencia de toxina diarreica en los bivalvos (DSP). En la estación de la ría de Pontevedra, 15 muestras de mejillón (5 individuos por cada altura) se recogieron durante la floración de *Dinophysis acuminata* en la zona de cultivo de mejillones. La frecuencia de muestreo fue variable según las circunstancias del episodio tóxico. Se tomaron muestras a los dos (1-Bueu, recogidas el 30 de junio de 2010), diez (2-Bueu, recogidas el 8 de julio de 2010), dieciséis (3-Bueu, recogidas el 14 de julio de 2010) y setenta y dos días (4-Bueu, recogidas el 15 de septiembre de 2010)

desde el cierre de explotación de los polígonos. En la estación de la ría de Arousa (Grove, recogidas el 14 de julio de 2010), 15 animales se tomaron durante el inicio del desarrollo temprano de la floración. Las muestras control (18 mejillones) procedentes de la ría de Arousa (Caramiñal, recogidas el 29 de septiembre de 2009) fueron recogidas dos meses después de la desaparición de episodio tóxico en la zona.

Se extrajeron los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto a cada mejillón. Tras la disección, las muestras destinadas a RT-qPCR se almacenaron en *RNAlater*[®] (Ambion, ref. 7024) a -20°C según las instrucciones del fabricante. Las muestras de glándula digestiva utilizadas para la extracción y el análisis de toxinas (ácido okadaico, AO) fueron congeladas a -20°C.

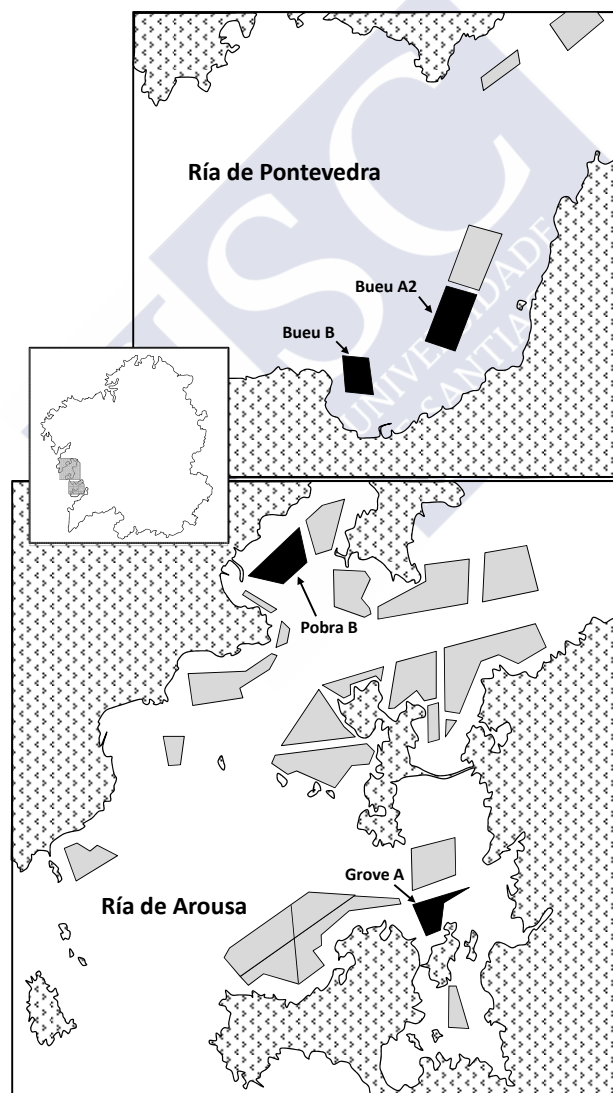


Figura 36. Situación de las áreas dedicadas al cultivo de *Mytilus galloprovincialis* en las dos principales rías de Galicia: Arousa y Pontevedra. Las muestras de mejillón fueron recogidas de bateas dentro de los polígonos resaltados en negro a tres profundidades (1, 5 y 10 metros).

5.2.2.- Extracción de toxinas y análisis de ácido okadaico.

Para la cuantificación del ácido okadaico total (ácido okadaico + formas conjugadas) se diseccionaron las glándulas digestivas y se extrajeron las toxinas mediante homogeneización con metanol 100% en una proporción (1:4, p:v). El homogeneizado obtenido se clarificó por centrifugación a 48.000 g durante 20 min. Una alícuota de este extracto se sometió a una hidrólisis alcalina según el procedimiento de Vale and Sampayo (1999) ligeramente modificado. Brevemente, el método consistió en agregar 62,5 µL de NaOH 2,5 N a 0,5 mL de extracto, calentarlo a 76°C durante 40 min en un vial cerrado y finalmente neutralizar el extracto agregando 62,5 µL de HCl 2,5 N. El análisis del extracto hidrolizado, previa filtración por un filtro de jeringa de Nylon de 0.22 µm de poro, se llevó a cabo por HPLC-MS/MS con SPE online, según la técnica de Regueiro *et al.* (2011) con un sistema cromatográfico Thermo Accela acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuádruplo Thermo Quantum Access MAX por medio de una interfase electrospray HESI-II. La cuantificación se llevó a cabo mediante la comparación de la respuesta obtenida en el análisis de las muestras con la de una solución de referencia de ácido okadaico suministrada por el NRC de Canadá.

5.2.3.- Extracción de RNA y transcripción inversa.

En la extracción de RNA para los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto conservados en *RNAlater*[®] a -20°C se utilizaron aproximadamente 20 mg de muestra. En el caso de la glándula digestiva la extracción de RNA se realizó con el kit comercial *RNAqueous*[®] (Ambion, ref. AM1912), en branquia y manto se utilizó el kit *NucleoSpin*[®] *RNA II* (Machery-Nagel, ref. 740955.250) según las instrucciones del fabricante. Como en extracciones anteriores, todas las muestras se sometieron a una precipitación con cloruro de litio para eliminar el DNA. Una vez resuspendido el precipitado de RNA en 60 µL de *RNase-free* H₂O (Macherey-Nagel) se mezcló con medio volumen de la solución de cloruro de litio 7,5 M y se dejó incubar a -20°C toda la noche. A la mezcla se le añadió 1 mL de etanol al 75% y se centrifugó durante 15 min a 4°C, la fase acuosa se descartó y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. El RNA obtenido se resuspendió en 30 µL de una solución libre de RNasa, *RNA Storage Solution* (Ambion, ref. AM7001).

Siguiendo las indicaciones anteriormente mencionadas en el capítulo I (apartado 3.3.2 de materiales y métodos), las muestras de RNA se trataron con DNasa empleando el kit comercial *Turbo DNA-free*[™] (Ambion, ref. AM1907) y a continuación se estimó la calidad y cantidad de RNA. El grado de pureza y la cantidad de RNA se determinó por espectrofotometría UV (ND-1000 de NanoDrop) midiendo la absorbancia a 260 nm,

la relación A260/280 y A260/230 deben ser $\geq 1,8$ (Tabla A1 del Anexo). La integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa visualizando las bandas de rRNA (Figuras A4, A5, A6 del Anexo). Las muestras se prepararon mezclando 2 μL de cada RNA, 4 μL de *Glioxal Load Dye* (Ambion, ref. AM8551) y agua hasta completar un volumen de 10 μL . La mezcla se incubó a 50°C durante 30 min y se cargó en un gel de agarosa D1 (Pronadisa, ref. 8008) al 1% en tampón TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) 0,5 X.

La transcripción inversa de las muestras se llevó a cabo con *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (BioRad, ref. 170-8891). Al volumen correspondiente de 0,6 μg de RNA total se le añadieron 4 μL de *5X iScript Reaction Mix*, 1 μL *iScript Reverse Transcriptase* y agua hasta completar un volumen de 20 μL . La reacción se calentó a 25°C durante 5 min, 42°C durante 30 min y 85°C durante 5 min (Tabla 14).

Tabla 14. Componentes y volumen de los reactivos empleados en la transcripción inversa.

Componente	Volumen (μL)
RNA total (0,6 μg)	x μL
5x <i>iScript Reaction Mix</i>	4 μL
<i>iScript Reverse Transcriptase</i>	1 μL
DEPC Water	hasta 20 μL
↓	
Incubar a 25°C durante 5 min, 42°C durante 30 min, 85°C durante 5 min.	

5.2.4.- Diseño de cebadores.

Los genes de referencia seleccionados en este estudio pertenecen a grupos funcionales diferentes para evitar una co-regulación entre ellos. Se diseñaron cebadores para ocho genes de referencia: NADH deshidrogenasa subunidad 4 (*nd4*), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gapdh*), citocromo c oxidasa subunidad I (*cox1*), proteína de fusión ubiquitina-proteína ribosomal S27 (*rps27*), factor eucariota de iniciación de la traducción 5A (*tif5a*), proteína S4 ribosomal 40S (*rps4*), actina (*act*) y RNA ribosómico 18S (*18S*). También tres pares de cebadores correspondientes a los genes de interés: *mrp1*, *mrp2* y *abcg2*.

Para el diseño de los cebadores de los genes *gapdh* y *rps27* se utilizó la secuencia consenso obtenida a partir de las secuencias recogidas en la Tabla 15. Los cebadores para los genes *nd4*, *cox1*, *tif5a*, *rps4*, *act* y *18S* se diseñaron a partir de secuencias de las bases de datos (Tabla 15). En el caso de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2*

los cebadores fueron diseñados a partir de las secuencias de los genes *abcc* y *abcg* descritas en los capítulos I y II respectivamente.

Los cebadores fueron diseñados con el programa en línea OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) (Tablas 15 y 16). Se comprobó la especificidad de cada pareja de cebadores mediante PCR en tiempo real cuantitativa y análisis de su *Tm*. Los productos amplificados se separaron en gel de agarosa y se verificaron por secuenciación.

Tabla 15. Nombre, función y número de acceso en GenBank para los genes de qPCR

Gen	Nombre del Gen	Función	Núm. Acceso
<i>mrp1</i>	Proteína de multirresistencia frente a fármacos	Multirresistencia frente a xenobióticos	FM1999810
<i>mrp2</i>	Proteína de multirresistencia frente a fármacos	Multirresistencia frente a xenobióticos	HE599221
<i>abcg2</i>	ABCG2	Multirresistencia frente a xenobióticos	HE599220
<i>nd4</i>	NADH deshidrogenasa subunidad 4	Fosforilación oxidativa en la mitocondria	NC_006886
<i>gapdh</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Enzima de la glucólisis y la gluconeogénesis	AJ625093, FL593798, FL496349
<i>cox1</i>	Citocromo c oxidasa subunidad I	Fosforilación oxidativa	NC_006886
<i>rps27</i>	Proteína de fusión ubiquitina-proteína ribosomal S27	Degradación de proteínas y componente estructural de la subunidad menor 40S del ribosoma	AJ625324, AJ516561, AJ625501
<i>tif5a</i>	Factor eucariota de iniciación de la traducción 5A	Participa en la traducción	FL593258
<i>rps4</i>	Proteína S4 ribosomal 40S	Componente estructural de la subunidad menor 40S del ribosoma	FL492874
<i>act</i>	Actina	Proteína estructural del citoesqueleto	AF157491
18S	RNA ribosómico 18S	Componente de la subunidad menor del ribosoma	L33452

Tabla 16. Relación de cebadores utilizados en la qPCR para el estudio de expresión en *Mytilus galloprovincialis*. BR: tejido de la branquia.

Gen	Cebador Sentido (5' - 3')	Cebador Antisentido (5' - 3')	Amplicon (pb)
<i>mrp1</i>	GACAAATCAGGGAATTCGAC	ATCATCAAGACACCAAGCCG	99
<i>mrp2</i>	ATGGTACTCGACAACGGAAAG	GATGATTCCAGAGTCCTTGC	105
<i>abcg2</i>	ACGCATTGGATATAAATGAG	GACATGGCCCCCTAGTGCAAC	154
<i>abcg2</i> (BR)	AGCAACATGCTCAGGGACTG	GACATGGCCCCCTAGTGCAAC	105
<i>nd4</i>	CAGCCCCACCTAGTCTAAATC	AGCAAGCCCTAATAAAGCTCAT	114
<i>gapdh</i>	AGGAATGGCCTTCAGGGTAC	TCAGATGCTGCTTTAATGGCTG	114
<i>cox1</i>	TGCTCATTGGCATTGGGTGTC	AGTTCCTGCTCAGTCCATCTCAC	151
<i>rps27</i>	CGTGAATGTCCCAACGAAGAG	TGTTGCCTCTGGTTTGTGA	114
<i>tif5a</i>	ACGCTACTTGACATTACGATG	AGCTAGTTCTTCTCCCATAGC	171
<i>rps4</i>	TGGGTTATCGAGGGCGTAG	TCCCTAGTTTGTGAGGACCTG	121
<i>act</i>	TCTTGATTCGAGCAGGAAATG	GGATGGTTGGAATAATGATTCTG	138
<i>18S</i>	TCGATGGTACGTGATATGCC	CGTTTCTCATGCTCCCTCTC	84

5.2.5.- PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR).

La PCR en tiempo real cuantitativa se realizó con el kit *SsoFastTM EvaGreen[®] Supermix* (BioRad, ref. 172-5201). Para ello, todas las muestras (93 mejillones) correspondientes a un gen y un tejido fueron incluidas en la misma placa de 96 pocillos junto con dos controles. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 μ L y estaba compuesta por 4 μ L de cDNA diluido (24 ng), 10 μ L *SsoFastTM EvaGreen[®] Supermix* (BioRad, ref. 172-5201), 0,8 μ L de cada cebador a una concentración de 10 μ M (concentración final: 400 nM) y 4,4 μ L de *PCR-grade water* (Roche, ref. 03315843001). Todas las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador *iCycler iQTM* (BioRad) usando el programa de termociclado que se detalla en la Tabla 17. El último paso del programa permitió la construcción de una curva de fusión o *melting* con la que se comprobó la amplificación de los fragmentos esperados.

Tabla 17. Condiciones de la qPCR para la amplificación de los genes en *Mytilus galloprovincialis*.

Procedimiento	Temperatura	Tiempo (s)	Ciclos
Activación de la enzima	95°C	30	1
Desnaturalización	95°C	5	
Hibridación + Extensión	60°C	10	40
Medida de fluorescencia	75°C	10	
	95°C	20	1
	60°C	20	1
Curva de fusión	Incrementos de 0,5°C desde 60°C hasta 95°C	10	80

La cuantificación mediante qPCR se basa en la determinación del *Cq* (*Quantification cycle* también denominado *Ct: threshold cycle*, o *Cp: crossing point*) para cada cDNA en cada experimento de qPCR. El *Cq* es el número de ciclos necesarios para alcanzar un umbral en la señal de fluorescencia. Para comparar los datos obtenidos a partir de diferentes placas de experimentación, los valores de *Cq* fueron obtenidos utilizando el mismo valor umbral, ajustado manualmente, para cada gen (Tablas 18, 19 y 20). Dicho valor umbral debe estar en la fase exponencial de la curva de amplificación

Tabla 18. Parámetros de la recta patrón de los genes empleados en la qPCR en glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*. r: coeficiente de correlación.

Gen	Umbral	Dilución	Puntos ^a	r	Pendiente	Eficiencia (%)
<i>mrp1</i>	300	1:4	4	0,983	-3,193	105,7
<i>mrp2</i>	250	1:4	5	0,99	-3,387	97,4
<i>abcg2</i> ^b	253,7	1:3	4	0,993	-3,016	114,6
<i>nd4</i>	300	1:5	6	0,996	-3,189	105,8
<i>gapdh</i>	300	1:5	6	0,992	-3,338	99,3
<i>cox1</i>	300	1:5	6	0,996	-3,712	85,9
<i>rps27</i>	300	1:5	6	0,996	-3,531	92
<i>tif5a</i>	300	1:5	6	0,988	-3,400	96,9
<i>rps4</i>	300	1:5	6	0,994	-3,554	91,1
<i>act</i>	300	1:5	5	0,993	-3,557	91
<i>18S</i>	300	1:5	5	0,99	-3,342	99,2

^a Número de puntos de la recta patrón.

^b A partir de producto de PCR.

Tabla 19. Parámetros de la recta patrón de los genes empleados en la qPCR en branquia de *Mytilus galloprovincialis*. r: coeficiente de correlación.

Gen	Umbral	Dilución	Puntos ^a	r	Pendiente	Eficiencia (%)
<i>mrp1</i>	250	1:3	5	0,99	-3,310	100,5
<i>mrp2</i> ^b	250	1:5	6	0,991	-3,285	101,6
<i>abcg2</i> ^b	250	1:10	6	0,999	-3,732	85,3
<i>nd4</i>	250	1:5	6	0,997	-3,311	100,5
<i>gapdh</i>	250	1:5	5	0,992	-3,158	107,3
<i>cox1</i>	250	1:5	6	0,994	-3,382	97,6
<i>rps27</i>	250	1:5	6	0,994	-3,294	101,2
<i>tif5a</i>	250	1:5	6	0,994	-3,338	99,3
<i>rps4</i>	250	1:5	6	0,996	-3,489	93,5
<i>act</i>	250	1:5	6	0,991	-3,078	111,3
<i>18S</i>	250	1:5	6	0,999	-3,656	87,7

^a Número de puntos de la recta patrón.

^b A partir de producto de PCR.

Tabla 20. Parámetros de la recta patrón de los genes empleados en la qPCR en manto de *Mytilus galloprovincialis*. *r*: coeficiente de correlación.

Gen	Umbral	Dilución	Puntos ^a	<i>r</i>	Pendiente	Eficiencia (%)
<i>mrp1</i> ^b	200	1:5	6	0,996	-3,408	96,5
<i>mrp2</i> ^b	200	1:5	6	0,998	-3,289	101,4
<i>abcg2</i> ^b	200	1:5	6	0,997	-3,573	90,5
<i>nd4</i>	200	1:5	6	0,997	-3,300	100,9
<i>gapdh</i>	200	1:5	5	0,992	-3,409	96,5
<i>cox1</i>	200	1:5	6	0,996	-3,542	91,6
<i>rps27</i>	200	1:5	6	0,99	-3,388	97,3
<i>tif5a</i>	200	1:5	5	0,991	-3,217	104,6
<i>rps4</i>	200	1:5	6	0,998	-3,426	95,8
<i>act</i>	200	1:5	6	0,996	-3,314	100,3
<i>18S</i>	200	1:5	6	0,996	-3,475	94

^a Número de puntos de la recta patrón.^b A partir de producto de PCR.

5.2.6.- Determinación de la eficiencia de la amplificación en cada gen.

Se realizaron curvas patrón para cada gen en cada tejido a partir de diluciones seriadas de una muestra de cDNA para el estudio de los datos de expresión obtenidos en el experimento. Se prepararon una serie de diluciones 1:3, 1:4 y 1:5 a partir de una muestra de cDNA obtenida de un *pool* de todas las muestras de RNA y 1:10 a partir de un fragmento de PCR purificado para el gen *abcg2* de *M. galloprovincialis*. El rango de concentraciones de cDNA varía desde 24 ng hasta $2,96 \times 10^{-4}$ µg para la serie de diluciones 1:3, desde 24 ng hasta $9,37 \times 10^{-5}$ µg para la serie 1:4, y desde 24 ng hasta $7,68 \times 10^{-6}$ µg para la serie 1:5. La reacción de amplificación se realizó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para la qPCR pero por triplicado para cada una de las diluciones.

La recta fue generada automáticamente por parte del termociclador *iCycler iQ*TM (BioRad) (Figura A7, A8 y A9 del Anexo) al igual que la eficiencia de la PCR y el coeficiente de correlación (Tablas 18, 19 y 20). La eficiencia de la PCR fue calculada mediante la Ecuación 1.

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

$$E (\%) = (10^{-1/m} - 1) \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde *E* (%) es la eficiencia de la PCR expresada en porcentaje, y *m* es la pendiente de la recta de la gráfica obtenida (Kubista *et al.*, 2006).

5.2.7.- Selección de los genes de referencia.

La medida de la expresión génica por medio de qPCR la hacemos por cuantificación relativa, en la que se compara el nivel de expresión del gen de interés respecto a la expresión de uno o varios genes de referencia (también llamado gen interno, gen constitutivo o en inglés *housekeeping gene*). Es lo que se denomina como normalización de la expresión del gen de interés. Para que la cuantificación sea correcta es necesario evaluar si los genes de referencia se expresan de forma estable en las muestras de estudio independiente de las condiciones del experimento. Se recomienda el empleo de más de un gen de referencia para obtener una correcta normalización. En el presente trabajo se emplearon varios programas para seleccionar los mejores genes de referencia en cada tejido: *geNorm* 3.5 (Vandesompele *et al.*, 2002), *NormFinder* v. 0.953 (Andersen *et al.*, 2004) y *BestKeeper* (Pfaffl *et al.*, 2004).

El programa *geNorm* realiza dos análisis: determina la estabilidad de los genes seleccionados (M) y valora el número mínimo de genes de referencia necesarios para una correcta normalización ($V_{n/n+1}$). De manera que los genes con una menor M presentan la mayor estabilidad dentro del grupo de muestras que estamos analizando. Vandesompele *et al.* (2002) proponen el uso de al menos tres genes de referencia para una correcta normalización.

Otro programa, *Normfinder*, permite estimar la variación de la expresión de los genes dentro y entre los grupos definidos por el investigador. De este modo, los genes con una variación inter- e intra grupo mínima son considerados como los más estables, poseyendo un valor de estabilidad (S) mínimo.

Por último, el programa *BestKeeper*, calcula una serie de estadísticos descriptivos sobre los valores de *Cq* y genera coeficientes de correlación entre cada gen y el índice *BestKeeper* (media geométrica de los valores *Cq* para los genes de referencia candidatos).

Los valores de *Cq* obtenidos a partir del *iCycler iQ™* (BioRad) se utilizaron directamente para los cálculos de estabilidad con el análisis *BestKeeper*. En el caso del análisis con *geNorm* y *NormFinder* los valores de *Cq* se transformaron en cantidades relativas (*relative quantities*, RQ) (Hellemans *et al.*, 2007) :

$$RQ = (1 + E)^{\Delta Cq}$$

ΔCq = valor de *Cq* más bajo de todas las muestras de este gen - valor *Cq* de la muestra

5.2.8.- Cálculo de la expresión normalizada.

Una vez seleccionados los mejores genes de referencia se ha de normalizar la expresión de los genes de interés en relación a los genes de referencia. En el presente trabajo se ha calculado la expresión de un gen a partir de su *Cq* utilizando la Ecuación 2. Esta ecuación incluye la eficiencia (E) de la reacción de PCR obtenida a partir de diluciones seriadas de cDNA según la Ecuación 1.

$$\text{Expresión } gen = (1 + E_{gen})^{-Cq_{gen}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Finalmente, para normalizar la expresión del gen de interés dividiremos su expresión por la media geométrica de la expresión de los genes de referencia mediante la Ecuación 3.

Ecuación 3:

$$\text{Expresión normalizada del } gen = \frac{(1 + E_{gen})^{-Cq_{gen}}}{\sqrt[n]{(1 + E_{ref1})^{-Cq_{ref1}} \times (1 + E_{ref2})^{-Cq_{ref2}} \times \dots \times (1 + E_{refn})^{-Cq_{refn}}}}$$

5.2.9.- Análisis estadístico.

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de los datos obtenidos. Previamente los datos se transformaron calculando el logaritmo (base 2) para cumplir los criterios de normalidad y homogeneidad de las varianzas. Se efectuaron comparaciones múltiples *a posteriori* empleando los test de Diferencia Honestamente Significativa de Tukey (HSD de Tukey), Dunnett y Games-Howell con el objetivo de encontrar diferencias significativas entre los grupos. También, se hizo el análisis de correlación lineal de Pearson para establecer el grado de asociación entre la concentración de ácido okadaico en el tejido de la glándula digestiva y la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2*. Se consideraron diferencias significativas para un valor de significación $p < 0,05$. El análisis estadístico se llevó a cabo con el paquete estadístico IBM SPSS 19.0.

5.3.- RESULTADOS.

5.3.1.- Análisis de la concentración de ácido okadaico en glándula digestiva.

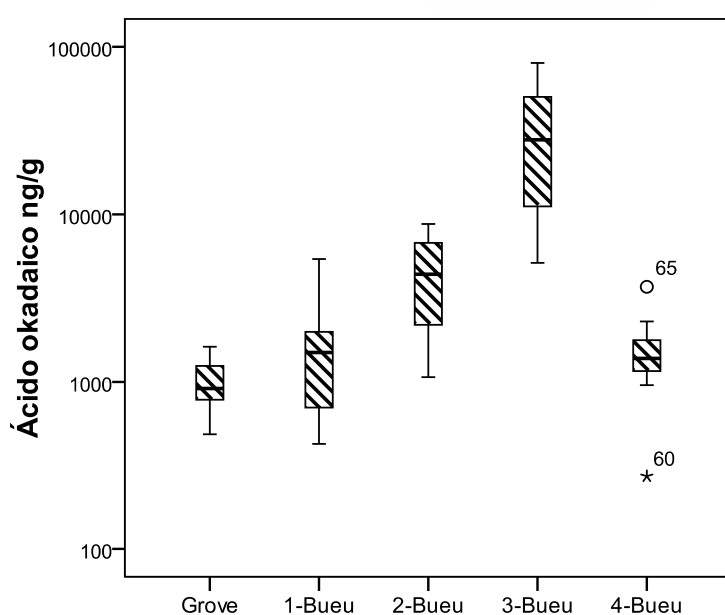
La concentración de toxinas presente en cada uno de las muestras de glándula digestiva de mejillón se determinó por HPLC-MS/MS. La principal toxina detectada fue el ácido okadaico.

En la Tabla 21 y la Figura 37 se muestran las concentraciones de ácido okadaico (ng/g) así como la concentración promedio en los mejillones a las tres profundidades muestreadas procedentes de bateas de las rías gallegas (como se detalla en el apartado 5.2.1 de materiales y métodos de este capítulo).

Al comienzo del episodio tóxico, en junio de 2010, se detectaron altos niveles de AO que fueron aumentando hasta alcanzar valores máximos a mediados de julio, y descendiendo a medida que finalizaba el episodio tóxico. En 1-Bueu, a finales de junio, a los dos días del cierre de explotación por el episodio los niveles de toxina oscilaban entre 425,6 ng/g y 5.414,1 ng/g, incrementándose ligeramente a los 5 y 10 metros de profundidad. Durante julio, las muestras obtenidas a los diez días (2-Bueu) presentaron concentraciones entre 1.068,1 ng/g y 8.760,3 ng/g, descendiendo los valores hacia mayores profundidades; y a los dieciséis días (3-Bueu) se alcanzaron las máximas concentraciones de AO a 5 y 10 metros (niveles de AO entre 7.434,7 ng/g y 80.052,7 ng/g). Durante el muestreo de septiembre en 4-Bueu (a los setenta y dos días del cierre) los valores de AO se mantuvieron entre 880,6 ng/g y 3.694,1 ng/g y su distribución vertical no mostró grandes diferencias. Los valores en Grove oscilaron entre 272,8 ng/g y 1.620,9 ng/g. Las muestras control, recogidas en la ría de Arousa durante septiembre de 2009, mostraron en algunos casos niveles traza de AO y en otros valores indetectables por HPLC-MS/MS.

Tabla 21. Concentración de ácido okadaico (ng/g) en glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*. LOD: Límite de detección. Profundidad (en metros): 1, 5 y 10.

MUESTRA	GROVE	1-BUEU	2-BUEU	3-BUEU	4-BUEU	MUESTRA	CONTROL
M1_1m	1.589	425,6	6.757,4	8.806,1	1.379,6	CR1	<LOD
M2_1m	873,8	533,5	8.416,5	7.434,7	1.696,6	CR2	<LOD
M3_1m	1.245,4	749,9	6.975,6	11.798,9	2.295,4	CR3	5,63
M4_1m	1.150,2	658,2	8.760,3	5.135,5	2.72,7	CR4	<LOD
M5_1m	486,7	582,2	5.252,2	11.169,2	956,2	CR5	1,63
Promedio 1m	1.069	589,9	7.232,4	8.868,9	1.320.10	CR6	1,05
M1_5m	1.115	1.289,3	4.096,8	19.951,3	1.160,8	CR7	1,11
M2_5m	814,2	1.596,3	4.715,3	31.274,6	1.774	CR8	<LOD
M3_5m	859,6	2.144,8	6.690,2	27.852,2	1.157,4	CR9	<LOD
M4_5m	272,8	1.496,7	2.852	25.203,1	2.072,7	CR10	1,10
M5_5m	1.367	1.978	4.423,5	48.414,6	3.694,1	CR11	1,22
Promedio 5m	885,7	1.701	4.555,6	30.539,2	1.971,8	CR13	0,64
M1_10m	1.620,9	2.002,7	1.552,1	50.252	1.338,8	CR14	3,84
M2_10m	669,4	1.887,1	1.988,6	53.194	1.977,7	CR15	0,47
M3_10m	782,6	2.242,4	2.190,1	80.052,7	1.269,4	CR16	<LOD
M4_10m	953,7	975,7	3.594,4	57.486,1	880,6	CR17	<LOD
M5_10m	759,4	5.414,1	1.068,1	77.892,2	1.473,2	CR18	<LOD
Promedio 10m	957,2	2.504,4	2.078,6	63.775,4	1.387,9	CR19	0,84
Promedio profundidades	970,6	1.598,4	4.622,2	34.394,5	1.559,9	Promedio	1,77

**Figura 37.** Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de ácido okadaico (ng/g) en glándula digestiva de muestras de *Mytilus galloprovincialis* a lo largo del episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*. La línea central de la caja indica la mediana, la línea superior e inferior indica los percentiles 25 y 75 respectivamente. Los bigotes superior e inferior corresponden a los valores máximo y mínimo.

5.3.2.- Confirmación de la especificidad de los cebadores.

Para cada pareja de cebadores se analizó la curva de fusión o *melting* generada a fin de confirmar la especificidad de la qPCR. La aparición de un sólo pico confirma la presencia de un único producto específico generado, así como la ausencia de otros artefactos (Figuras A10, A11, A12 del Anexo). Además, se efectuaron electroforesis en gel de agarosa (Pronadisa, ref. 8008) al 2% de los productos de la qPCR para confirmar por secuenciación la longitud del amplicon y la especificidad de la reacción.

5.3.3.- Análisis de estabilidad de los genes de referencia.

La selección de los genes de referencia para normalizar la expresión de un gen de interés puede variar con el tipo de muestra y con las condiciones del experimento entre otros factores. Se llevaron a cabo cuatro análisis, el primero para estudiar la estabilidad de los ocho genes de referencia en el conjunto de muestras control de los tres tejidos (glándula digestiva, branquia y manto) con el fin de encontrar un grupo de genes de referencia suficientemente estable para comparar la expresión de los genes de interés entre tejidos. Los otros tres análisis determinaron la estabilidad de los genes de referencia en el grupo de muestras pertenecientes a un mismo tejido (glándula digestiva, branquia y manto) durante un episodio tóxico. Los análisis se llevaron a cabo empleando los tres programas mencionados anteriormente (ver apartado 5.2.7 de este mismo capítulo).

El programa *geNorm* usa un método matemático basado en el principio de que la relación de expresión entre dos genes de referencia propuestos debería de ser constante en todas las muestras. Para cada gen de referencia, se calcula la variación (entre parejas) con los otros posibles genes de referencia así como la desviación estándar de las razones de expresión transformado logarítmicamente, seguida por el cálculo de los valores de estabilidad de los genes de referencia (valor M) como el promedio de la variación (entre pares) de un gen de referencia determinado con todos los demás genes de referencia candidatos. Los genes con un bajo valor de M tendrán la máxima estabilidad de expresión. El gen con el mayor valor de M es excluido del análisis y el cálculo se repite de una forma secuencial hasta que se encuentren los dos mejores genes (Vandesompele *et al.*, 2002). En la representación gráfica que se obtiene con el programa *geNorm* el gen con el mayor valor de M, que es excluido en cada uno de los pasos se le atribuye la media de los valores de M de los genes restantes. Una vez excluido este gen se repite el cálculo con los genes restantes y se elimina el gen con mayor valor de M. Así sucesivamente hasta que sólo quedan dos genes que son los que aparecen como más estables.

En cuanto a *NormFinder*, Andersen *et al.* (2004) desarrollaron un modelo matemático lineal de efectos mixtos de la expresión génica que permite la estimación no sólo de la variación total de los genes candidatos de referencia, sino también, de la variación entre los distintos subgrupos del conjunto de muestras. *NormFinder* clasifica los mejores genes de referencia de acuerdo con su mínima variación (el valor de estabilidad) tanto dentro de los grupos como entre grupos. Los genes con un valor bajo de estabilidad tienen la expresión más estable. El valor de estabilidad representa una medida práctica del error sistemático, que se introduce en el resultado final cuando se usa dicho gen como gen de referencia (Andersen *et al.*, 2004).

Por último, *BestKeeper* (Pfaffl *et al.*, 2004) calcula la estadística descriptiva a partir de los valores de *Cq* para cada gen y los coeficientes de correlación de Pearson entre cada par de genes candidatos. El principio para la identificación de los genes de referencia adecuados (expresión estable) es que su nivel de expresión debería estar altamente correlacionado. Para los genes candidatos que se expresan de forma estable, el índice elaborado por *BestKeeper* (*BestKeeper Index*) es la media geométrica de los valores de *Cq* de los genes de referencia. Después se calcula la correlación entre cada gen de referencia candidato y el índice. El programa calcula también la desviación estándar de los valores de *Cq*, un valor elevado indica que el gen no es buen candidato.

5.3.3.1.- En los tres tejidos conjuntamente.

En el procesado de los datos de la qPCR para el estudio comparativo de la expresión en los tres tejidos de mejillón se utilizó el método basado en la cinética de cada reacción de PCR. Los valores de fluorescencia brutos se exportaron al programa Real-time PCR Miner (Zhao y Fernald, 2005) para calcular los valores de *Cq* individuales en cada reacción de PCR. Este algoritmo identifica la fase exponencial de la curva de amplificación mediante la aplicación de un ajuste cinético basado en el modelo logístico de cuatro parámetros (*Four-parameter logistic model*, FPLM), luego utiliza un proceso de regresión no-lineal y el análisis promedio ponderado para calcular un valor de eficiencia final. Para ajustar la parte exponencial de la curva es necesario conocer donde termina la fase exponencial de la PCR cuantitativa. Los valores de *Cq* deben ser determinados dentro de la fase exponencial para reflejar la concentración inicial de la plantilla. El método utilizado para estimar los valores de *Cq* es el máximo de la segunda derivada (SDM) (Tichopad *et al.*, 2003).

El primer análisis de la estabilidad de los genes de referencia, realizado con el programa *geNorm*, permitió determinar los genes más estables en los tres tejidos. Los genes de referencia más estables fueron: *gapdh*, *rps4* y *rps27* (Tabla 22 y Figura 38).

El segundo programa empleado para el análisis de estabilidad de los genes de referencia fue el *NormFinder*. Los tres primeros genes más estables obtenidos a partir de los valores de estabilidad fueron: *gapdh*, *rps4* y *rps27* (Tabla 22 y Figura 38).

El último programa empleado, *BestKeeper*, atendiendo al coeficiente de correlación (r) determinó como los tres genes de referencia más estables: *rps27*, *gapdh* y *rps4* (Tablas 22 y 23).

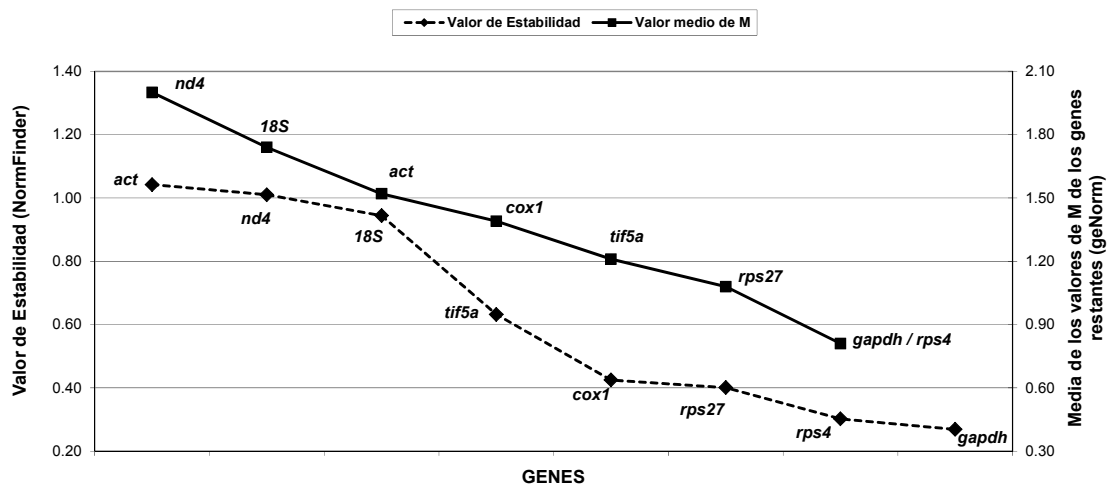


Figura 38. Genes de referencia para la normalización de la qPCR en los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto de *Mytilus galloprovincialis* ordenados por su estabilidad calculada con los programas *geNorm* y *NormFinder*.

El programa *geNorm* además de determinar la estabilidad de los genes de referencia permite calcular el número óptimo de genes necesarios con el parámetro $V_{n/n+1}$ (Figura 39) en este caso, el valor mínimo se obtiene para $V_{5/6} = 0,257$ indicando que cinco genes de referencia sería el número más adecuado para emplear en este estudio.

Atendiendo a los resultados obtenidos con los tres programas los genes de referencia seleccionados para una correcta normalización en los tres tejidos (glándula digestiva, branquia y manto) son *gapdh*, *rps4*, *rps27* y *cox1* cuya justificación se expone posteriormente en la discusión de este capítulo.

Tabla 22. Clasificación de los ocho genes de referencia obtenidos a partir de los programas *geNorm*, *NormFinder* y *BestKeeper* en los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto de *Mytilus galloprovincialis*. r: coeficiente de correlación; SD: desviación estándar.

Clasificación	geNorm	Valor medio M	NormFinder	Valor de estabilidad	BestKeeper	r	BestKeeper	SD
1	<i>gapdh</i> / <i>rps4</i>	0,81	<i>gapdh</i>	0,269	<i>rps27</i>	0,81	<i>cox1</i>	0,82
2	<i>gapdh</i> / <i>rps4</i>	0,81	<i>rps4</i>	0,302	<i>gapdh</i>	0,80	<i>rps4</i>	0,97
3	<i>rps27</i>	1,08	<i>rps27</i>	0,401	<i>rps4</i>	0,79	<i>gapdh</i>	1,08
4	<i>tif5a</i>	1,21	<i>cox1</i>	0,425	<i>tif5a</i>	0,71	<i>rps27</i>	1,34
5	<i>cox1</i>	1,39	<i>tif5a</i>	0,632	<i>cox1</i>	0,64	<i>tif5a</i>	1,48
6	<i>act</i>	1,52	<i>18S</i>	0,944	<i>nd4</i>	0,59	<i>act</i> / <i>18S</i>	1,53
7	<i>18S</i>	1,74	<i>nd4</i>	1,010	<i>act</i>	0,47	<i>act</i> / <i>18S</i>	1,53
8	<i>nd4</i>	2,00	<i>act</i>	1,042	<i>18S</i>	0,41	<i>nd4</i>	2,50

Tabla 23. Determinación de los genes de referencia más estables con el programa *BestKeeper* para la normalización de la qPCR en los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto de *Mytilus galloprovincialis*. N: número de muestras; GM [Cq]: media geométrica de las Cq; AM [Cq] media aritmética de las Cq; Min [Cq] y Max [Cq]: valores extremos de Cq; SD [\pm Cq]: desviación estándar de las Cq; CV [%Cq]: coeficiente de variación expresado como el porcentaje del nivel de Cq; r: coeficiente de correlación de cada gen con el índice *BestKeeper*.

	<i>nd4</i>	<i>gapdh</i>	<i>cox1</i>	<i>rps27</i>	<i>tif5a</i>	<i>rps4</i>	<i>act</i>	<i>18S</i>
N	53	53	53	53	53	53	53	53
GM [Cq]	22,2	21,92	17,3	20,64	22,97	20,49	24,29	20,24
AM [Cq]	22,36	21,96	17,34	20,71	23,05	20,53	24,36	20,31
Min [Cq]	17,43	19,63	15	18,02	19,07	18,61	19,63	17,72
Max [Cq]	27,02	25,26	22,11	25,76	29,61	24,39	28,4	24,77
SD [\pm Cq]	2,5	1,08	0,82	1,34	1,48	0,97	1,53	1,53
CV [%Cq]	11,18	4,91	4,74	6,49	6,41	4,71	6,28	7,51
coeff. de corr. [r]	0,59	0,8	0,64	0,81	0,71	0,79	0,47	0,41
p-valor	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

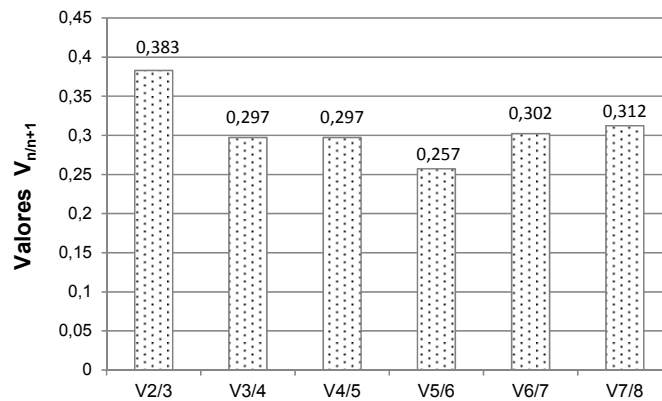


Figura 39. Variaciones entre pares ($V_{n/n+1}$) de los ocho genes de referencia en los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto de *Mytilus galloprovincialis* obtenido con el programa *geNorm*.

5.3.3.2.- En cada tejido individualmente.

Los valores de C_q utilizados aquí son los obtenidos con el *iCycler iQ™* (BioRad) empleando un umbral de 300 en glándula digestiva, 250 en branquia y 200 en manto.

5.3.3.2.1.- Glándula digestiva.

El análisis *geNorm* para la glándula digestiva mostró, en general, unos valores de M por debajo del límite establecido ($M = 1,5$). Los tres genes de referencia más estables fueron: *gapdh*, *rps4* y *cox1* (Tabla 24 y Figura 40).

Los resultados de los valores de estabilidad obtenidos con el programa *NormFinder* para los tres primeros genes fueron (de más a menos estable): *gapdh*, *rps4* y *cox1* con una estabilidad entre 0,088 y 0,318 (Tabla 24 y Figura 40).

La clasificación de estabilidad obtenida con el programa *BestKeeper*, empleando los valores de coeficiente de correlación (r), se muestra en las Tablas 24 y 25 donde los tres genes más estables fueron: *gapdh*, *rps4* y *tif5a*. Los menores valores de desviación estándar se obtienen en *gapdh*, *cox1* y *rps4*.

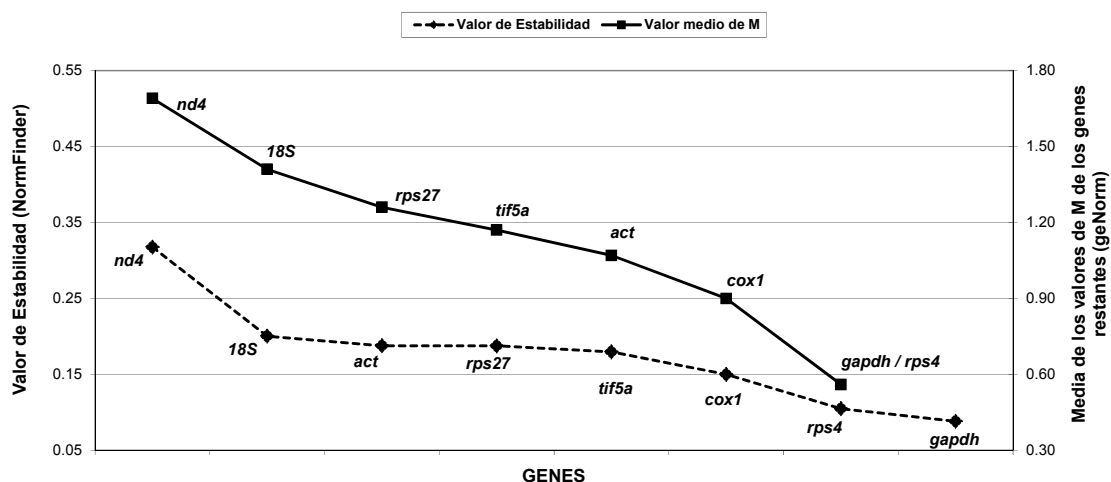


Figura 40. Genes de referencia para la normalización de la qPCR en glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* ordenados por su estabilidad calculada con los programas *geNorm* y *NormFinder*.

Una vez que los genes de referencia quedaron ordenados de acuerdo a su estabilidad, el número de genes necesarios para la normalización fue calculado mediante el parámetro $V_{n/n+1}$ (Figura 41) con el programa *geNorm*. En este caso, el menor valor se obtiene para $V_{5/6} = 0,203$ por lo que serían cinco los genes de referencia que se deberían utilizar en este tejido.

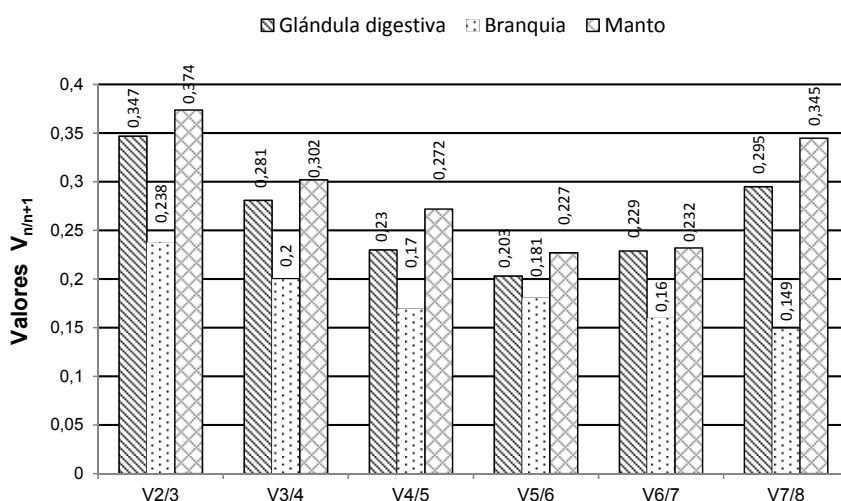


Figura 41. Variaciones entre pares ($V_{n/n+1}$) de los genes de referencia en glándula digestiva, branquia y manto de *Mytilus galloprovincialis* obtenido con el programa *geNorm*.

Tabla 24. Clasificación de los ocho genes de referencia obtenidos a partir de los programas *geNorm*, *NormFinder* y *BestKeeper* en tejido de glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*. r: coeficiente de correlación; SD: desviación estándar.

Clasificación	geNorm	Valor medio M	NormFinder	Valor de estabilidad	BestKeeper	r	BestKeeper	SD
1	<i>gapdh</i> / <i>rps4</i>	0,56	<i>gapdh</i>	0,088	<i>gapdh</i>	0,78	<i>gapdh</i>	0,76
2	<i>gapdh</i> / <i>rps4</i>	0,56	<i>rps4</i>	0,105	<i>rps4</i>	0,77	<i>cox1</i>	0,84
3	<i>cox1</i>	0,9	<i>cox1</i>	0,150	<i>tif5a</i>	0,71	<i>rps4</i>	0,88
4	<i>act</i>	1,07	<i>tif5a</i>	0,180	<i>act</i>	0,67	18S	1,06
5	<i>tif5a</i>	1,17	<i>rps27</i> / <i>act</i>	0,188	<i>rps27</i> / <i>nd4</i>	0,58	<i>rps27</i>	1,11
6	<i>rps27</i>	1,26	<i>rps27</i> / <i>act</i>	0,188	<i>rps27</i> / <i>nd4</i>	0,58	<i>act</i>	1,12
7	18S	1,41	18S	0,200	<i>cox1</i>	0,52	<i>tif5a</i>	1,19
8	<i>nd4</i>	1,69	<i>nd4</i>	0,318	18S	0,38	<i>nd4</i>	2,15

Tabla 25. Determinación de los genes de referencia más estables con el programa *BestKeeper* para la normalización de la qPCR en glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*. N: número de muestras; GM [Cq]: media geométrica de las Cq; AM [Cq] media aritmética de las Cq; Min [Cq] y Max [Cq]: valores extremos de Cq; SD [\pm Cq]: desviación estándar de las Cq; CV [%Cq]: coeficiente de variación expresado como el porcentaje del nivel de Cq; r: coeficiente de correlación de cada gen con el índice *BestKeeper*.

	<i>nd4</i>	<i>gapdh</i>	<i>cox1</i>	<i>rps27</i>	<i>tif5a</i>	<i>rps4</i>	<i>act</i>	18S
N	92	92	92	92	92	92	92	92
GM [Cq]	22,92	22,67	17,35	21,66	24,20	21,18	26,38	19,48
AM [Cq]	23,06	22,69	17,38	21,70	24,25	21,20	26,41	19,54
Min [Cq]	18,10	20,50	15,20	18,70	21,30	18,80	24,00	17,20
Max [Cq]	27,70	25,20	20,90	25,60	28,70	24,60	31,20	26,80
SD [\pm Cq]	2,15	0,76	0,84	1,11	1,19	0,88	1,12	1,06
CV [%Cq]	9,34	3,34	4,84	5,11	4,89	4,15	4,26	5,40
coeff. de corr. [r]	0,58	0,78	0,52	0,58	0,71	0,77	0,67	0,38
p-valor	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

En general con los tres programas se obtuvieron resultados comparables. Si consideramos los tres primeros genes con mayor estabilidad en los tres programas existe una coincidencia de al menos 2 de ellos. Por este motivo y otros que se detallan en el

apartado 5.3.5.1 de este capítulo, son 3 genes de referencia los empleados para la normalización en la glándula digestiva: *gapdh*, *rps4* y *cox1* (Tabla 24).

5.3.3.2.2.- Branquia.

Para el análisis de estabilidad de los genes de referencia en la branquia el programa *geNorm* mostró a la *gapdh*, *rps4* y *cox1* como los genes más estables (Tabla 26 y Figura 42).

De acuerdo con el programa *NormFinder*, los valores de estabilidad obtenidos muestran que los tres genes más estables fueron: *cox1*, *rps4* y *gapdh* (Tabla 26 y Figura 42).

El análisis de estabilidad empleando el programa *BestKeeper*, atendiendo al coeficiente de correlación (r), mostró como los tres genes de referencia más estables fueron: *cox1*, *rps4* y *rps27* (Tablas 26 y 27). Los menores valores de desviación estándar se obtienen para *cox1*, *rps4*, *gapdh* y *18S*.

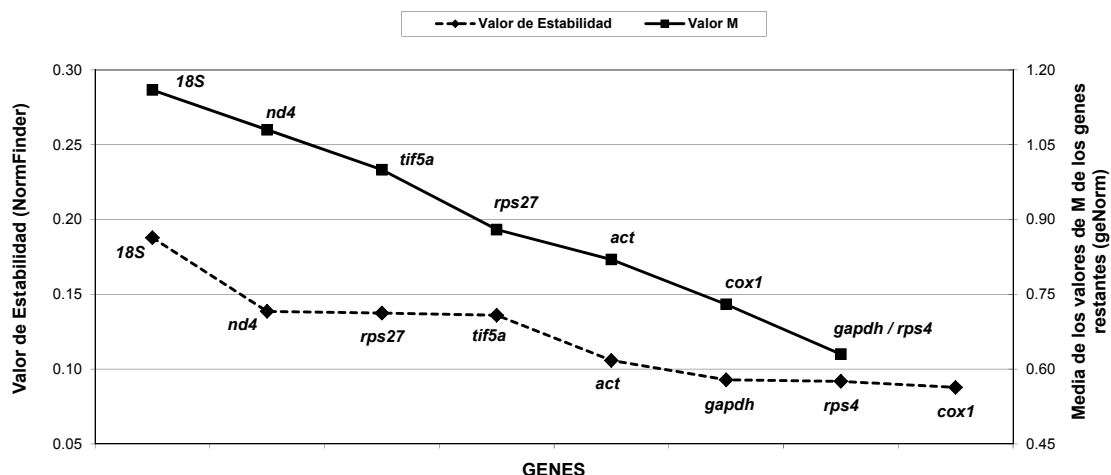


Figura 42. Genes de referencia para la normalización de la qPCR en branquia de *Mytilus galloprovincialis* ordenados por su estabilidad calculada con los programas *geNorm* y *NormFinder*.

En la Figura 41 y mediante el parámetro $V_{n/n+1}$, calculado con el programa *geNorm*, se estudió el número de genes de referencia necesarios para la normalización de los datos en este tejido. En el tejido de la branquia los menores valores se obtienen para $V_{4/5} = 0,170$ y $V_{7/8} = 0,149$ por lo que serían cuatro o siete los genes de referencia que se deberían utilizar.

Tabla 26. Clasificación de los ocho genes de referencia obtenidos a partir de los programas *geNorm*, *NormFinder* y *BestKeeper* en tejido de branquia de *Mytilus galloprovincialis*. r: coeficiente de correlación; SD: desviación estándar.

Clasificación	geNorm	Valor medio M	NormFinder	Valor de estabilidad	BestKeeper	r	BestKeeper	SD
1	<i>gapdh</i> / <i>rps4</i>	0,63	<i>cox1</i>	0,088	<i>cox1</i> / <i>rps4</i>	0,87	<i>cox1</i>	0,56
2	<i>gapdh</i> / <i>rps4</i>	0,63	<i>rps4</i>	0,092	<i>cox1</i> / <i>rps4</i>	0,87	<i>rps4</i>	0,67
3	<i>cox1</i>	0,73	<i>gapdh</i>	0,093	<i>rps27</i>	0,86	<i>gapdh</i> / 18S	0,78
4	<i>act</i>	0,82	<i>act</i>	0,106	<i>gapdh</i>	0,84	<i>gapdh</i> / 18S	0,78
5	<i>rps27</i>	0,88	<i>tif5a</i>	0,136	<i>act</i>	0,81	<i>rps27</i>	0,87
6	<i>tif5a</i>	1	<i>rps27</i>	0,137	<i>tif5a</i>	0,77	<i>act</i>	0,90
7	<i>nd4</i>	1,08	<i>nd4</i>	0,139	<i>nd4</i>	0,65	<i>nd4</i>	0,92
8	18S	1,16	18S	0,188	18S	0,33	<i>tif5a</i>	1,08

Tabla 27. Determinación de los genes de referencia más estables con el programa *BestKeeper* para la normalización de la qPCR en branquia de *Mytilus galloprovincialis*. N: número de muestras; GM [Cq]: media geométrica de las Ct; AM [Cq] media aritmética de las Cq; Min [Cq] y Max [Cq]: valores extremos de Cq; SD [\pm Cq]: desviación estándar de las Cq; CV [% Cq]: coeficiente de variación expresado como el porcentaje del nivel de Cq; r: coeficiente de correlación de cada gen con el índice *BestKeeper*.

	<i>nd4</i>	<i>gapdh</i>	<i>cox1</i>	<i>rps27</i>	<i>tif5a</i>	<i>rps4</i>	<i>act</i>	18S
N	93	93	93	93	93	93	93	93
GM [Cq]	20,63	21,00	16,26	20,11	23,31	19,78	24,67	19,09
AM [Cq]	20,67	21,03	16,29	20,16	23,36	19,81	24,70	19,12
Min [Cq]	18,00	19,50	14,90	17,90	20,90	18,10	22,00	16,70
Max [Cq]	26,70	26,90	24,20	30,10	30,30	25,30	30,80	21,50
SD [\pm Cq]	0,92	0,78	0,56	0,87	1,08	0,67	0,90	0,78
CV [%Cq]	4,47	3,73	3,45	4,32	4,63	3,41	3,65	4,08
coeff. de corr. [r]	0,65	0,84	0,87	0,86	0,77	0,87	0,81	0,33
p-valor	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

De acuerdo con los tres programas los genes de referencia más estables seleccionados (ver apartado 5.3.5.2 de este capítulo) para la normalización del tejido de la branquia son *gapdh*, *rps4* y *cox1* (Tabla 26).

5.3.3.2.3.- Manto.

Para el análisis de estabilidad de los genes de referencia en el tejido de manto la clasificación obtenida con el programa *geNorm* muestra que los tres genes más estables fueron: *gapdh*, *rps4* y *rps27* (Tabla 28 y Figura 43).

Atendiendo a los valores de estabilidad obtenidos con el programa *NormFinder*, en manto, los genes más estables fueron: *rps4*, *rps27* y *gapdh* con unos valores que oscilaron entre 0,094 y 0,339 (Tabla 28 y Figura 43).

Los tres genes más estables obtenidos con el programa *BestKeeper* fueron: *rps4*, *tif5a* y *rps27* (Tablas 28 y 29). Los menores valores de desviación estándar se obtienen para *18S*, *rps4* y *gapdh*.

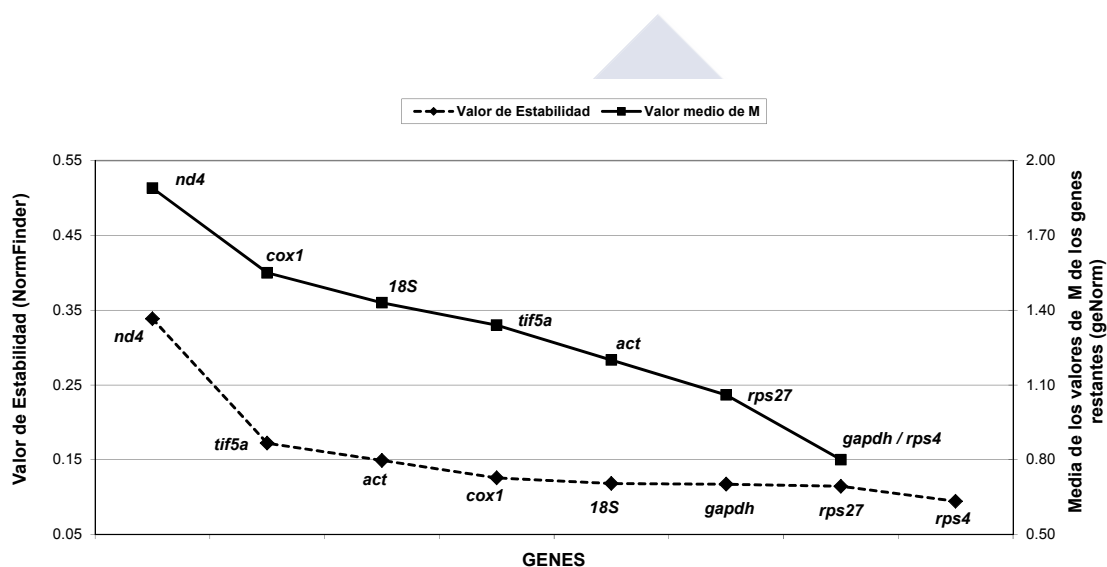


Figura 43. Genes de referencia para la normalización de la qPCR en manto de *Mytilus galloprovincialis* ordenados por su estabilidad calculada con los programas *geNorm* y *NormFinder*.

Para determinar el número mínimo de genes de referencia para la normalización de la expresión en el tejido de manto se calculó con el parámetro $V_{n/n+1}$ del programa *geNorm* (Figura 41), observando que el menor valor obtenido es para $V_{5/6} = 0,227$ siendo cinco los genes necesarios para este estudio.

De este modo y a la vista de los resultados obtenidos con los tres programas, para una correcta normalización en manto, los genes de referencia seleccionados (cuya justificación se explicará en el apartado 5.3.5.3 de este capítulo) son: *gapdh*, *rps27* y *rps4* (Tabla 28).

Tabla 28. Clasificación de los ocho genes de referencia obtenidos a partir de los programas *geNorm*, *NormFinder* y *BestKeeper* en tejido de manto de *Mytilus galloprovincialis*. r: coeficiente de correlación; SD: desviación estándar.

Clasificación	geNorm	Valor medio M	NormFinder	Valor de estabilidad	BestKeeper	r	BestKeeper	SD
1	<i>gapdh</i> / <i>rps4</i>	0,8	<i>rps4</i>	0,094	<i>rps4</i>	0,76	18S	0,89
2	<i>gapdh</i> / <i>rps4</i>	0,8	<i>rps27</i>	0,114	<i>tif5a</i>	0,74	<i>rps4</i>	0,97
3	<i>rps27</i>	1,06	<i>gapdh</i>	0,117	<i>rps27</i>	0,70	<i>gapdh</i>	1,15
4	<i>act</i>	1,2	18S	0,118	<i>gapdh</i>	0,69	<i>rps27</i>	1,18
5	<i>tif5a</i>	1,34	<i>cox1</i>	0,126	<i>act</i> / 18S	0,68	<i>tif5a</i>	1,25
6	18S	1,43	<i>act</i>	0,149	<i>act</i> / 18S	0,68	<i>cox1</i>	1,32
7	<i>cox1</i>	1,55	<i>tif5a</i>	0,172	<i>cox1</i>	0,65	<i>act</i>	1,42
8	<i>nd4</i>	1,89	<i>nd4</i>	0,339	<i>nd4</i>	0,49	<i>nd4</i>	2,37

Tabla 29. Determinación de los genes de referencia más estables con el programa *BestKeeper* para la normalización de la qPCR en manto de *Mytilus galloprovincialis*. N: número de muestras; GM [Cq]: media geométrica de las Ct; AM [Cq]: media aritmética de las Cq; Min [Cq] y Max [Cq]: valores extremos de Cq; SD [\pm Cq]: desviación estándar de las Cq; CV [% Cq]: coeficiente de variación expresado como el porcentaje del nivel de Cq; r: coeficiente de correlación de cada gen con el índice *BestKeeper*.

	<i>nd4</i>	<i>gapdh</i>	<i>cox1</i>	<i>rps27</i>	<i>tif5a</i>	<i>rps4</i>	<i>act</i>	18S
N	93	93	93	93	93	93	93	93
GM [Cq]	22,90	21,69	17,18	20,42	22,24	19,60	22,54	21,18
AM [Cq]	23,06	21,74	17,26	20,48	22,31	19,64	22,62	21,21
Min [Cq]	17,70	19,20	14,30	17,90	19,50	18,00	18,70	19,20
Max [Cq]	28,10	26,20	21,90	24,40	29,30	22,70	29,60	25,20
SD [\pm Cq]	2,37	1,15	1,32	1,18	1,25	0,97	1,42	0,89
CV [%Cq]	10,29	5,31	7,63	5,75	5,62	4,94	6,28	4,21
coeff. de corr. [r]	0,49	0,69	0,65	0,70	0,74	0,76	0,68	0,68
p-valor	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

5.3.4.- Estudio de la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* en tejidos de *Mytilus galloprovincialis*.

La normalización de los genes de la familia ABC se realizó en base al estudio de estabilidad de genes de referencia realizado en el apartado de resultados 5.3.3.1 de este capítulo en el que se seleccionaron cuatro genes de referencia para el estudio de expresión en los tejidos de mejillón: *gapdh*, *cox1*, *rps27* y *rps4*.

Las variaciones entre pares ($V_{n/n+1}$) del programa *geNorm* permite determinar el número de genes de referencia necesarios para que la normalización sea precisa. Vandesompele *et al.*, (2002) proponen una variación de genes dos a dos de $V = 0,15$ como punto de corte por debajo del cual la adición de más genes de referencia no sería necesario. Entre tejidos los valores entre pares de genes fueron superiores a los establecidos. Sin embargo, Ling y Salvaterra (2011) proponen que el número de genes de referencia a emplear es aquel que presente el menor valor de variaciones entre pares (en este caso sería para $V_{5/6} = 0,257$), siendo cinco los genes de referencia a emplear (Figura 39). No obstante, en el análisis llevado a cabo para la expresión de los genes estudio en tejidos de mejillón se emplearon cuatro genes de referencia (*gapdh*, *rps4*, *rps27* y *cox1*). La elección de estos genes se basa en la clasificación resultante de los análisis de estabilidad de los genes (Tabla 22) que muestra pocas variaciones entre las cuatro posiciones iniciales para los mejores candidatos con los tres programas, mientras que a partir del quinto gen hay discrepancias en la clasificación entre los programas *geNorm*, *NormFinder* y *BestKeeper*.

Para estudiar si la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* difiere entre los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto se realizó un análisis de varianza de los datos obtenidos, seguido de comparaciones múltiples *a posteriori* para identificar entre qué tejidos se han producido las diferencias. La variable dependiente (la expresión normalizada relativa) fue previamente transformada en logaritmo base 2 antes de realizar el análisis estadístico.

En la Figura 44 se presentan los resultados correspondientes a los valores de la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* en los tres tejidos de *M. galloprovincialis*. El análisis global mostró la existencia de diferencias significativas entre los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto para los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* (Tabla 30). En los genes *mrp1* y *mrp2* los mayores valores de expresión se observaron en la glándula digestiva seguida de la branquia, mientras que en manto se detectaron bajos niveles de expresión. La expresión del gen *abcg2* fue significativamente mayor en manto que en la glándula digestiva. En branquia la expresión fue moderada y la menor expresión del gen *abcg2* se obtuvo en glándula digestiva.

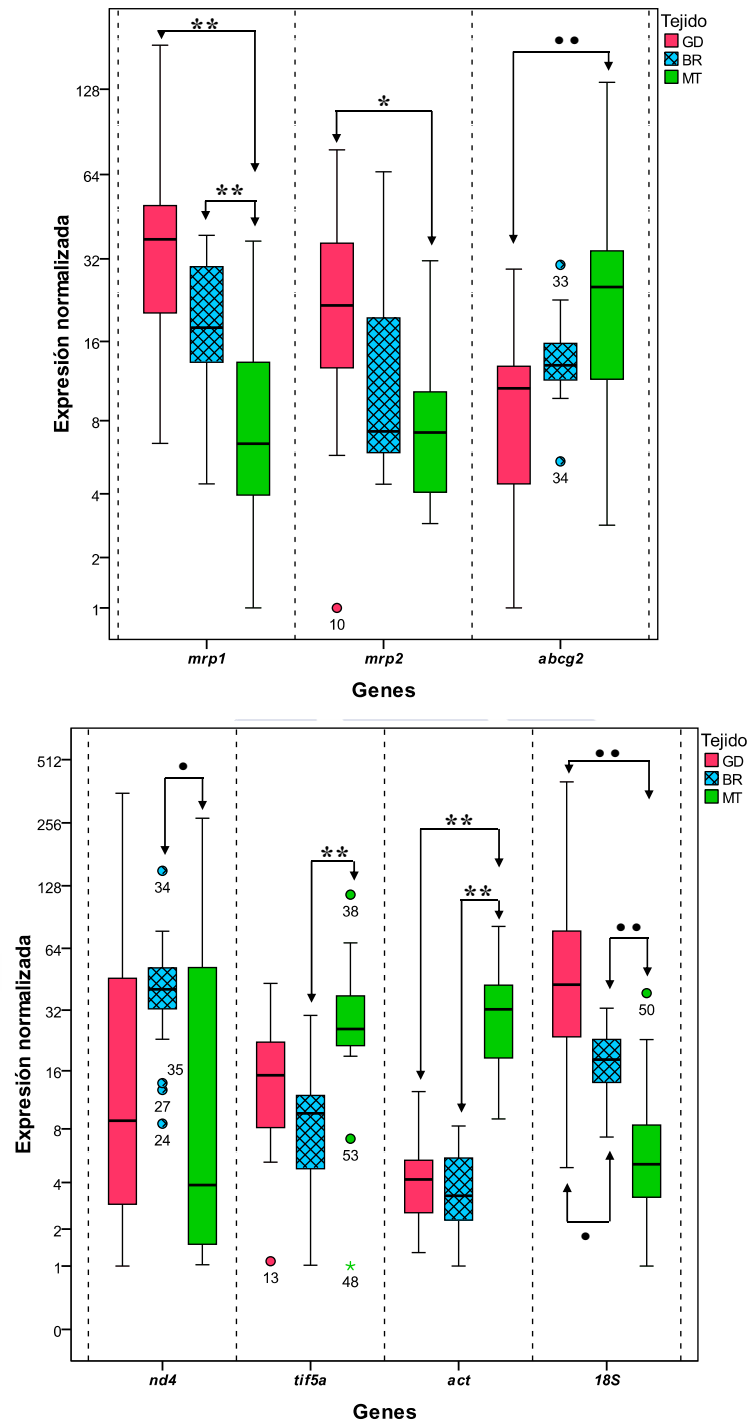


Figura 44. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de la expresión normalizada (en escala logarítmica base 2) de los genes en los tres tejidos de *Mytilus galloprovincialis*. La línea central de la caja indica la mediana, la línea superior e inferior indica los percentiles 25 y 75 respectivamente, los bigotes superior e inferior corresponden a los valores máximo y mínimo. GD: glándula digestiva; BR: branquia; MT: manto. Test HSD de Tukey: (*) la diferencia es significativa a nivel $p \leq 0,29$, (**) la diferencia es significativa a nivel $p \leq 0,004$; Games-Howell: (•) la diferencia es significativa a nivel $p \leq 0,015$, (••) la diferencia es significativa a nivel $p \leq 0,005$.

Tabla 30. Análisis de varianza (ANOVA) de los distintos genes en muestras de *Mytilus galloprovincialis* entre los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto. gl: grados de libertad; F: estadístico F de ANOVA.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Valor p
mrp1	Inter-grupos	52,728	2	26,364	18,03	,000
	Intra-grupos	73,111	50	1,462		
	Total	125,839	52			
mrp2	Inter-grupos	17,095	2	8,548	5,687	,006
	Intra-grupos	75,154	50	1,503		
	Total	92,249	52			
abcg2	Inter-grupos	21,73	2	10,865	7,834	,001
	Intra-grupos	69,34	50	1,387		
	Total	91,07	52			
nd4	Inter-grupos	42,553	2	21,276	4,118	,022
	Intra-grupos	258,324	50	5,166		
	Total	300,877	52			
tif5a	Inter-grupos	23,63	2	11,815	7,002	,002
	Intra-grupos	84,365	50	1,687		
	Total	107,995	52			
act	Inter-grupos	105,041	2	52,521	65,311	,000
	Intra-grupos	40,208	50	0,804		
	Total	145,249	52			
18S	Inter-grupos	82,276	2	41,138	25,005	,000
	Intra-grupos	82,258	50	1,645		
	Total	164,534	52			

Utilizando el test HSD de Tukey el gen *mrp1* mostró diferencias significativas entre los tejidos de la glándula digestiva y manto ($p = 0,000$), branquia y manto ($p = 0,001$), pero entre glándula digestiva y branquia ($p = 0,104$) no hubo diferencias. En el caso del gen *mrp2*, aplicando el mismo test, se encontraron diferencias significativas entre la glándula digestiva y manto ($p = 0,004$) pero sin diferencias entre glándula digestiva y branquia ($p = 0,180$) y entre branquia y manto ($p = 0,290$). Para el gen *abcg2* se detectaron diferencias significativas entre glándula digestiva y manto ($p = 0,005$), pero no entre los tejidos de glándula digestiva y branquia ($p = 0,067$) y, branquia y manto ($p = 0,121$) aplicando el test Games-Howell (Figura 44, Tablas 31 y 32).

El gen *tif5a* mostró diferencias significativas entre el tejido de branquia y manto ($p = 0,001$). El gen *act* presentó diferencias entre los tejidos de glándula digestiva y manto ($p = 0,000$) y entre branquia y manto ($p = 0,000$) ambos aplicando el test HSD de Tukey. Para los genes *nd4* y *18S* se usó el test de Games-Howell. El gen *nd4* indicó diferencias significativas entre los tejidos de branquia y manto ($p = 0,015$). En cuanto al gen *18S* se detectaron diferencias significativas entre todos los tejidos: glándula

digestiva y branquia ($p = 0,015$), glándula digestiva y manto ($p = 0,000$), y branquia y manto ($p = 0,000$) (Figura 44, Tablas 31 y 32).

Tabla 31. Comparaciones múltiples *a posteriori* con el test HSD de Tukey de los distintos genes en muestras de *Mytilus galloprovincialis* entre los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto. GD: glándula digestiva; BR: branquia; MT: manto.

Variable dependiente	(I) Tejido	(J) Tejido	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Valor p	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
<i>mrp1</i>	GD	BR	,8504	,4090	,104	-,137	1,838
		MT	2,3889*	,4031	,000	1,415	3,362
	BR	GD	-,8504	,4090	,104	-1,838	,137
		MT	1,5385*	,4090	,001	,551	2,526
	MT	GD	2,3889*	,4031	,000	-3,362	-1,415
		BR	-1,5385*	,4090	,001	-2,526	-,551
<i>mrp2</i>	GD	BR	,7461	,4146	,180	-,255	1,748
		MT	1,3767*	,4087	,004	,390	2,364
	BR	GD	-,7461	,4146	,180	-1,748	,255
		MT	,6306	,4146	,290	-,371	1,632
	MT	GD	-1,3767*	,4087	,004	-2,364	-,390
		BR	-,6306	,4146	,290	-1,632	,371
<i>tif5a</i>	GD	BR	,7516	,4393	,211	-,310	1,813
		MT	-,8889	,4330	,110	-1,935	,157
	BR	GD	-,7516	,4393	,211	-1,813	,310
		MT	-1,6405*	,4393	,001	-2,702	-,579
	MT	GD	,8889	,4330	,110	-,157	1,935
		BR	1,6405*	,4393	,001	,579	2,702
<i>act</i>	GD	BR	,3251	,3033	,536	-,407	1,058
		MT	-2,8017*	,2989	,000	-3,524	-2,080
	BR	GD	-,3251	,3033	,536	-1,058	,407
		MT	-3,1268*	,3033	,000	-3,859	-2,394
	MT	GD	2,8017*	,2989	,000	2,080	3,524
		BR	3,1268*	,3033	,000	2,394	3,859

Tabla 32. Comparaciones múltiples *a posteriori* con el test Games-Howell de los distintos genes en muestras de *Mytilus galloprovincialis* en tejidos de glándula digestiva, branquia y manto. GD: glándula digestiva; BR: branquia; MT: manto.

Variable dependiente	(I) Tejido	(J) Tejido	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Valor <i>p</i>	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
<i>abcg2</i>	GD	BR	-,8115	,3438	,067	-1,672	,049
		MT	-1,5533*	,4580	,005	-2,676	-,431
	BR	GD	,8115	,3438	,067	-,049	1,672
		MT	-,7419	,3597	,121	-1,644	,160
	MT	GD	1,5533*	,4580	,005	,431	2,676
		BR	,7419	,3597	,121	-,160	1,644
<i>nd4</i>	GD	BR	-15,609	,6494	,062	-3,190	,068
		MT	,5789	,8894	,793	-1,601	2,759
	BR	GD	15,609	,6494	,062	-,068	3,190
		MT	2,1398*	,6993	,015	,381	3,899
	MT	GD	-,5789	,8894	,793	-2,759	1,601
		BR	-2,1398*	,6993	,015	-3,899	-,381
<i>18S</i>	GD	BR	1,3285*	,4342	,015	,236	2,421
		MT	3,0167*	,4987	,000	1,789	4,245
	BR	GD	-1,3285*	,4342	,015	-2,421	-,236
		MT	1,6882*	,3247	,000	,880	2,496
	MT	GD	-3,0167*	,4987	,000	-4,245	-1,789
		BR	-1,6882*	,3247	,000	-2,496	-,880

5.3.5.- Estudio de la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* en *Mytilus galloprovincialis* durante un episodio tóxico.

Los análisis de expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* mediante qPCR se llevaron a cabo en los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto de mejillones control y mejillones afectados por un episodio tóxico por DSP.

Para estudiar si la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* difiere a lo largo de un episodio tóxico se realizó un análisis de varianza de los datos obtenidos, seguido de comparaciones múltiples *a posteriori* para identificar entre qué grupos hay diferencias. La variable dependiente, la expresión normalizada relativa, fue previamente transformada en logaritmo base 2 antes de realizar el análisis estadístico.

5.3.5.1.- Glándula digestiva.

Una vez que los genes de referencia quedaron ordenados de acuerdo a su estabilidad, se seleccionaron los que se emplearían en la normalización de los genes de

estudio en glándula digestiva. El programa *geNorm* permite determinar el número de genes de referencia necesarios para una normalización precisa mediante las variaciones entre pares ($V_{n/n+1}$). Una variación de genes dos a dos de $V = 0,15$ se propone como punto de corte (Vandesompele *et al.*, 2002) por debajo del cual la adición de más genes de referencia no sería necesario. En glándula digestiva los valores entre pares de genes fueron superiores a los establecidos. Por su parte, Ling y Salvaterra (2011) proponen que el número de genes de referencia a emplear en la normalización es aquel que presente el menor valor de variaciones entre pares (en este caso sería para $V_{5/6} = 0,203$). De manera que en glándula digestiva serían cinco los genes de referencia a emplear (Figura 41).

No obstante, en el análisis llevado a cabo para la expresión de los genes estudio en el tejido de la glándula digestiva se emplearon tres genes de referencia (*gapdh*, *cox1* y *rps4*), el mismo número de genes que proponen Vandesompele *et al.* (2002) como adecuado para una correcta normalización. La elección de estos genes se basa en la clasificación resultante de los análisis de estabilidad de los genes (Tabla 24) que muestra pocas variaciones entre las tres posiciones iniciales para los mejores candidatos con los tres programas, mientras que a partir del cuarto gen hay discrepancias en la clasificación entre los programas *geNorm*, *NormFinder* y *BestKeeper*. Cabe mencionar, que el análisis llevado a cabo empleando tres, cuatro o cinco genes de referencia para la normalización de los genes de estudio no mostró diferencias significativas entre los resultados de expresión (Figura 45).

En el análisis estadístico se eliminaron varias muestras en las que durante la reacción de qPCR no hubo amplificación. Las muestras excluidas fueron las correspondientes a Grove 4_5m; 2-Bueu 5_5m; 3-Bueu 3_1m y 5_10m; y 4-Bueu 4_5m y 4_10m. Los genes de referencia empleados en este experimento mostraron un amplio rango de niveles de expresión desde el valor de *Cq* más bajo (15,2) encontrado en el gen *cox1* hasta el más alto (31,2) en el gen *act*. En cuanto a los genes de interés (*mrp1*, *mrp2* y *abcg2*), los niveles de expresión variaron desde un valor de *Cq* de 24,1 en el gen *mrp1*, hasta 37,6 para el gen *mrp2* (Figura 46).

En la Figura 47 se muestran los valores de la expresión normalizada de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* en los diferentes muestreos: a los dos (1-Bueu), diez (2-Bueu), dieciséis (3-Bueu), y setenta y dos días (4-Bueu) desde el cierre de explotación de los polígonos en la ría de Pontevedra; y en la estación de la ría de Arousa (Grove) durante el inicio del desarrollo temprano de la floración. El análisis de varianza de las muestras indicó que el gen *mrp2* presenta diferencias significativas durante el episodio tóxico ($p = 0,001$), mientras que los genes *mrp1* ($p = 0,194$) y *abcg2* ($p = 0,229$) no mostraron diferencias significativas (Tabla 33). Cuando los valores de la expresión del gen *mrp2*

fueron analizados en la glándula digestiva, todas las comparaciones realizadas con el test Dunnett entre el grupo control y los diferentes muestreos fueron significativas ($p < 0,05$). Las diferencias significativas entre el grupo control y los muestreos 1-Bueu y 2-Bueu presentaron un valor de $p = 0,015$. En los restantes muestreos los valores obtenidos fueron de $p = 0,001$ para Grove, $p = 0,001$ para 3-Bueu y $p = 0,002$ para 4-Bueu (Figura 47 y Tabla 34).

El gen *act*, empleando el test Games-Howell, mostró diferencias significativas entre el grupo control y los muestreos 1-Bueu ($p = 0,014$) y 2-Bueu ($p = 0,002$) (Figura 47 y Tabla 35).

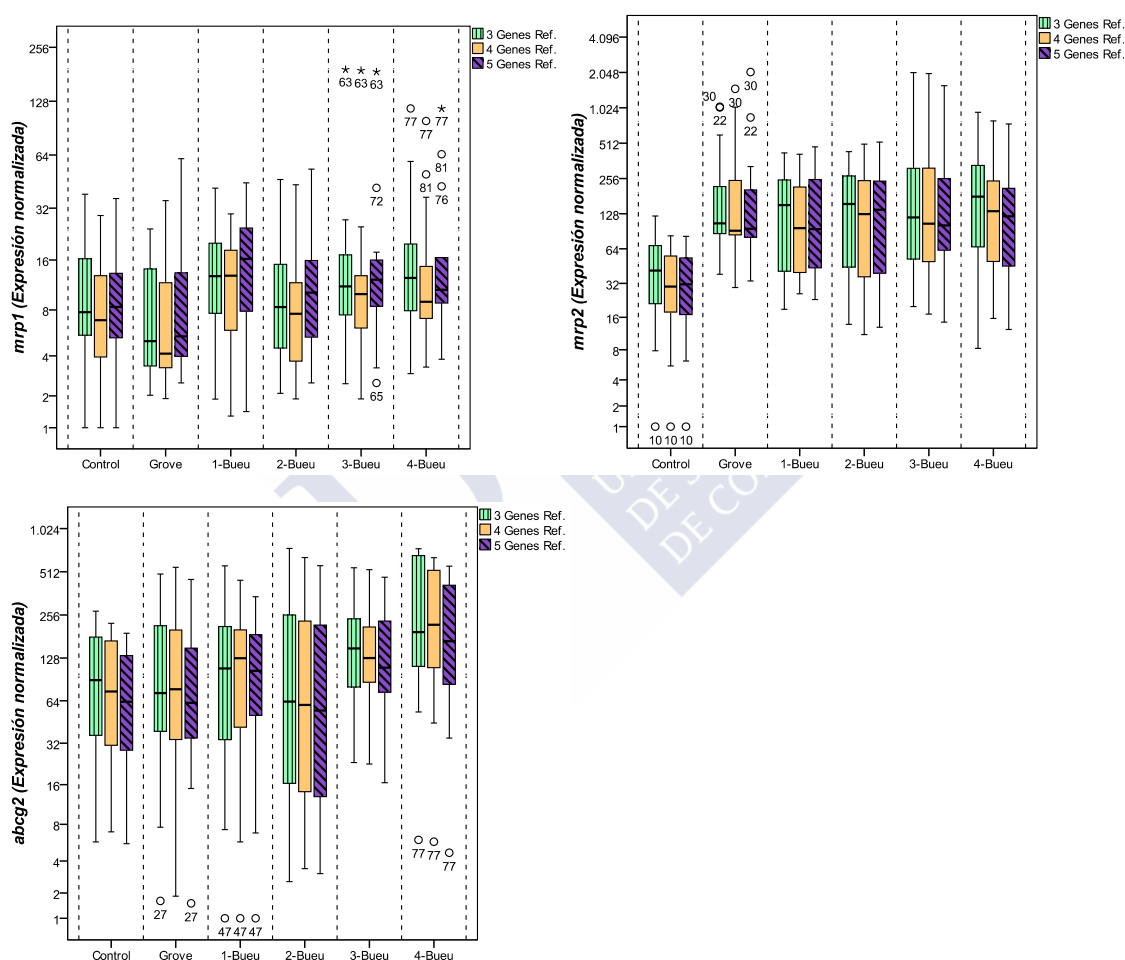


Figura 45. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de la expresión normalizada (en escala logarítmica base 2) empleando 3, 4 ó 5 genes de referencia en glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* para los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2*. Los genes de referencia empleados son: 3 Genes Ref. (*gapdh*, *rps4* y *cox1*), 4 Genes Ref. (*gapdh*, *rps4*, *cox1* y *tif5a*) y 5 Genes Ref. (*gapdh*, *rps4*, *cox1*, *tif5a* y *act*). La línea central de la caja indica la mediana, la línea superior e inferior indica los percentiles 25 y 75 respectivamente, los bigotes superior e inferior corresponden a los valores máximo y mínimo.

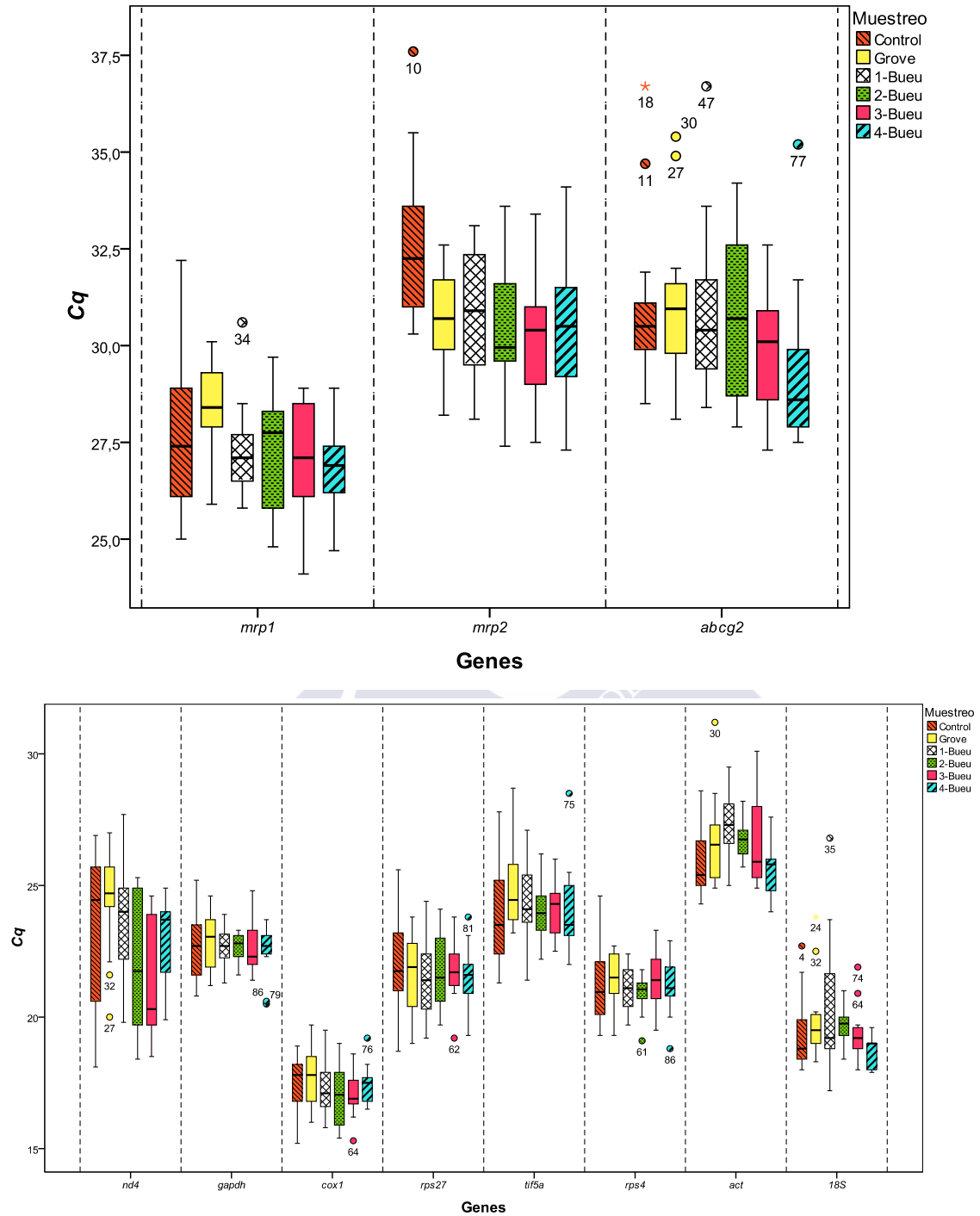


Figura 46. Diagrama de cajas y bigotes de los valores de *Cq* para los genes empleados en el estudio de expresión de muestras de *Mytilus galloprovincialis* a lo largo del episodio tóxico por *Dinophysis acuminata* en glándula digestiva. La línea central de la caja indica la mediana, la línea superior e inferior indica los percentiles 25 y 75 respectivamente, los bigotes superior e inferior corresponden a los valores máximo y mínimo.

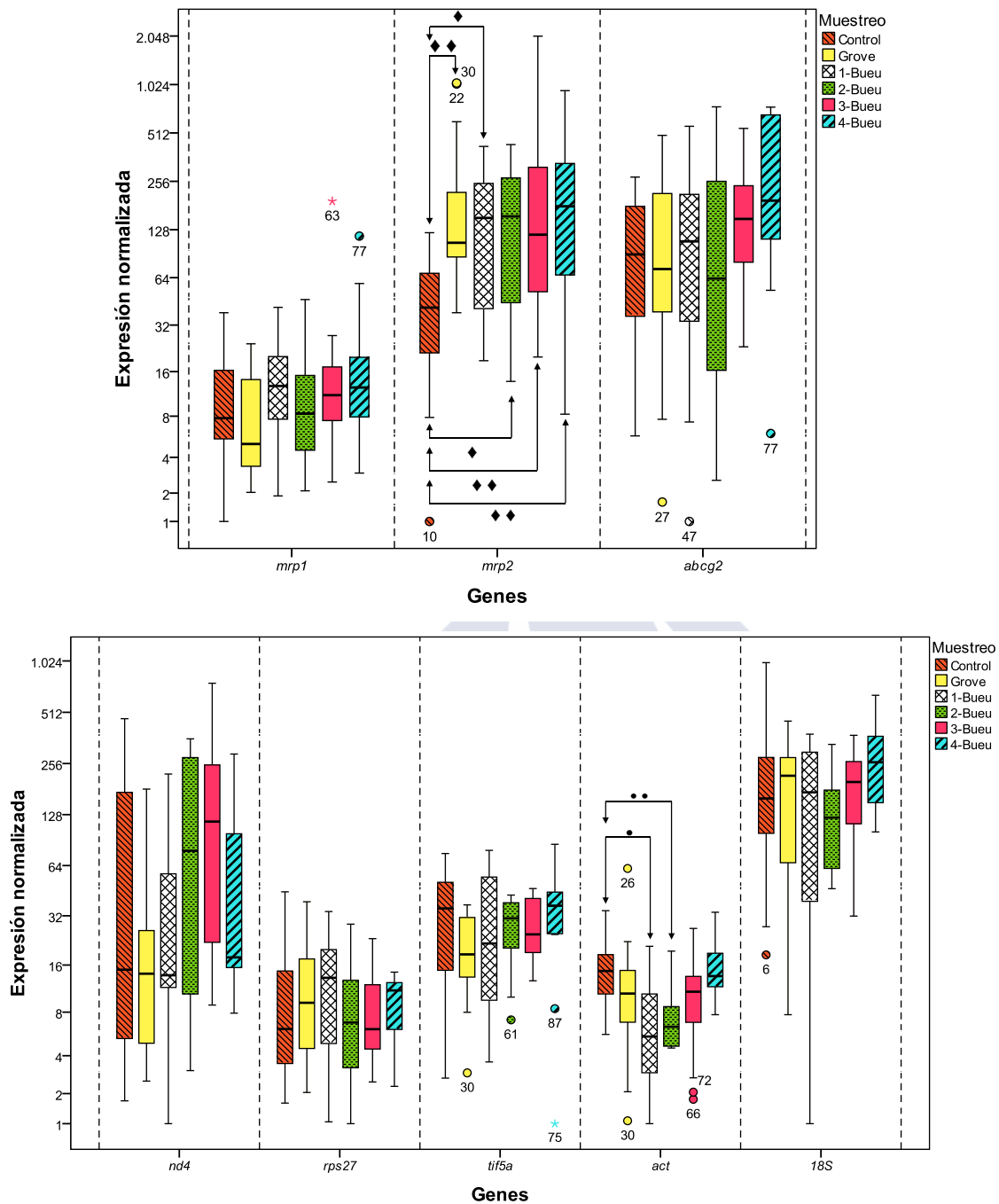


Figura 47. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de la expresión normalizada (en escala logarítmica base 2) de los genes en glándula digestiva para las muestras de *Mytilus galloprovincialis* recogidas durante un episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*. La línea central de la caja indica la mediana, la línea superior e inferior indica los percentiles 25 y 75 respectivamente, los bigotes superior e inferior corresponden a los valores máximo y mínimo. Test Dunnnett: (♦) la diferencia es significativa a nivel $p \leq 0,015$, (♦♦) la diferencia es significativa a nivel $p \leq 0,002$; Games-Howell: (•) la diferencia es significativa a nivel $p \leq 0,014$, (••) la diferencia es significativa a nivel $p \leq 0,002$.

Tabla 33. Análisis de varianza (ANOVA) de los diferentes genes en las muestras de *Mytilus galloprovincialis* en glándula digestiva. gl: grados de libertad; F: estadístico F de ANOVA.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Valor p
<i>mrp1</i>	Inter-grupos	13,677	5	2,735	1,517	,194
	Intra-grupos	146,090	81	1,804		
	Total	159,768	86			
<i>mrp2</i>	Inter-grupos	64,612	5	12,922	4,647	,001
	Intra-grupos	225,258	81	2,781		
	Total	289,870	86			
<i>abcg2</i>	Inter-grupos	29,798	5	5,960	1,411	,229
	Intra-grupos	342,059	81	4,223		
	Total	371,857	86			
<i>nd4</i>	Inter-grupos	64,226	5	12,845	2,516	,036
	Intra-grupos	413,539	81	5,105		
	Total	477,765	86			
<i>rps27</i>	Inter-grupos	4,649	5	,930	,575	,719
	Intra-grupos	130,882	81	1,616		
	Total	135,532	86			
<i>tif5a</i>	Inter-grupos	5,030	5	1,006	,704	,622
	Intra-grupos	115,734	81	1,429		
	Total	120,763	86			
<i>act</i>	Inter-grupos	25,740	5	5,148	4,764	,001
	Intra-grupos	87,527	81	1,081		
	Total	113,267	86			
<i>18S</i>	Inter-grupos	20,209	5	4,042	1,573	,177
	Intra-grupos	208,134	81	2,570		
	Total	228,342	86			

Tabla 34. Comparaciones múltiples *a posteriori* con el test Dunnett de los diferentes genes en las muestras de *Mytilus galloprovincialis* en glándula digestiva durante un episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*.

Variable dependiente	(I) Muestreo	(J) Muestreo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Valor p	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
<i>mrp2</i>	Grove	Control	2,2484*	,5943	,001	,715	3,782
	1-Bueu	Control	1,7659*	,5830	,015	,261	3,271
	2-Bueu	Control	1,8006*	,5943	,015	,267	3,334
	3-Bueu	Control	2,3229*	,6070	,001	,756	3,890
	4-Bueu	Control	2,2190*	,6070	,002	,652	3,786
<i>nd4</i>	Grove	Control	-,7253	,8052	,853	-2,804	1,353
	1-Bueu	Control	-,1152	,7899	1,000	-2,154	1,924
	2-Bueu	Control	12,704	,8052	,397	-,808	3,349
	3-Bueu	Control	18,815	,8224	,101	-,241	4,004
	4-Bueu	Control	,6238	,8224	,920	-1,499	2,747

Tabla 35. Comparaciones múltiples *a posteriori* con el test Games-Howell de los diferentes genes en las muestras de *Mytilus galloprovincialis* en glándula digestiva durante un episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*.

Variable dependiente	(I) Muestreo	(J) Muestreo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Valor <i>p</i>	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
<i>act</i>	Control	Grove	,5648	,4250	,766	-,778	1,907
		1-Bueu	1,3566*	,3694	,014	,210	2,503
		2-Bueu	1,0406*	,2404	,002	,309	1,772
		3-Bueu	,7298	,4002	,476	-,538	1,998
		4-Bueu	-,1733	,2589	,984	-,964	,617
	Grove	Control	-,5648	,4250	,766	-1,907	,778
		1-Bueu	,7917	,4982	,613	-,740	2,323
		2-Bueu	,4757	,4118	,851	-,841	1,792
		3-Bueu	,1649	,5215	1,000	-1,442	1,772
		4-Bueu	-,7381	,4229	,521	-2,078	,602
	1-Bueu	Control	-1,3566*	,3694	,014	-2,503	-,210
		Grove	-,7917	,4982	,613	-2,323	,740
		2-Bueu	-,3160	,3542	,944	-1,429	,797
		3-Bueu	-,6268	,4772	,775	-2,097	,843
		4-Bueu	-1,5298*	,3670	,005	-2,674	-,386
	2-Bueu	Control	-1,0406*	,2404	,002	-1,772	-,309
		Grove	-,4757	,4118	,851	-1,792	,841
		1-Bueu	,3160	,3542	,944	-,797	1,429
		3-Bueu	-,3108	,3862	,963	-1,552	,930
		4-Bueu	-1,2138*	,2367	,000	-1,946	-,482
	3-Bueu	Control	-,7298	,4002	,476	-1,998	,538
		Grove	-,1649	,5215	1,000	-1,772	1,442
		1-Bueu	,6268	,4772	,775	-,843	2,097
		2-Bueu	,3108	,3862	,963	-,930	1,552
		4-Bueu	-,9031	,3979	,257	-2,169	,363
	4-Bueu	Control	,1733	,2589	,984	-,617	,964
		Grove	,7381	,4229	,521	-,602	2,078
		1-Bueu	1,5298*	,3670	,005	,386	2,674
		2-Bueu	1,2138*	,2367	,000	,482	1,946
		3-Bueu	,9031	,3979	,257	-,363	2,169

Se observó que existe una tendencia similar entre la cantidad de mRNA del gen *mrp2* y la concentración de ácido okadaico (ng/g). El pico de mayor concentración de toxina en la glándula digestiva (34.394,5 ng/g para 3-Bueu) coincide con el de mayor expresión de la proteína *mrp2* (Figura 48). En el caso de los otros dos genes (*mrp1* y *abcg2*) no se observa ninguna relación entre la expresión de los genes y la concentración de AO.

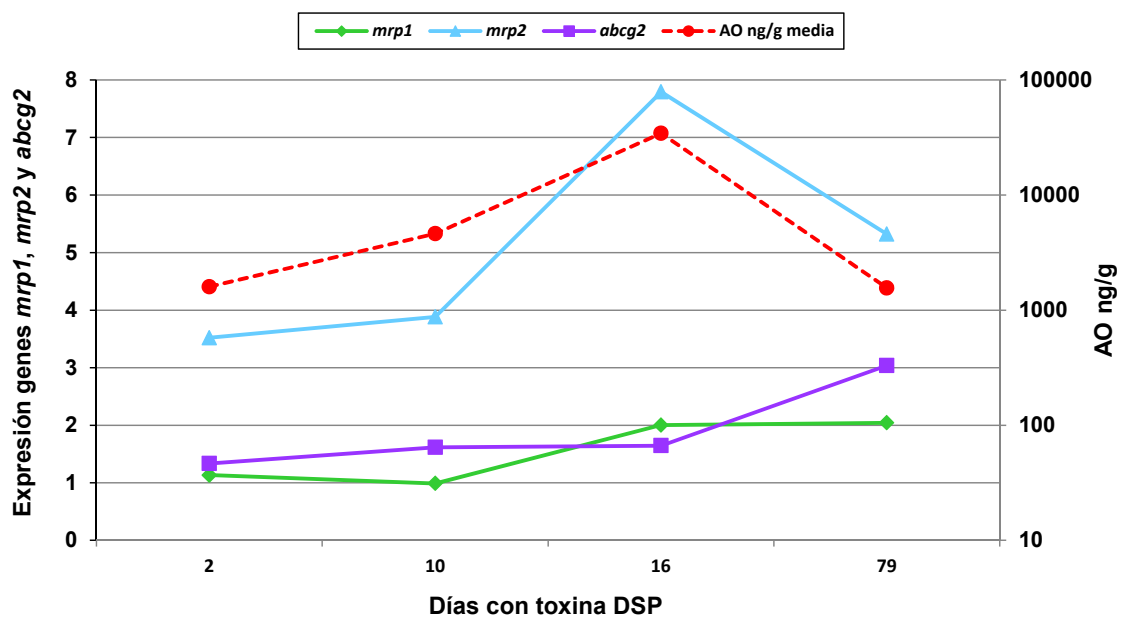


Figura 48. Niveles de expresión normalizada relativa en relación al control de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* y concentración de ácido okadaico (ng/g en escala logarítmica base 10) en tejido de glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*. AO: ácido okadaico. Días de cierre de explotación de los polígonos por toxina DSP: 2 (1-Bueu); 10 (2-Bueu); 16 (3-Bueu) y 79 (4-Bueu).

En el tejido de la glándula digestiva la expresión del gen *mrp1* es de 2 veces superior a la media del control en los mejillones intoxicados de los muestreos 3-Bueu y 4-Bueu. Para el gen *mrp2* y *abcg2* se observó una tendencia similar, la expresión fue superior a la media del control en todos los muestreos. En el caso de gen *mrp2*, se observó un aumento de la expresión a lo largo del ciclo de intoxicación (más de 3 veces superior a la media del control en 1-Bueu hasta casi 8 veces en 3-Bueu). Para el gen *abcg2*, la expresión fue 3 veces superior a la media del control en el muestreo 4-Bueu (Tabla 36 y Figura 48).

Tabla 36. Expresión normalizada en relación al control (media del control = 1) de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* en glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* durante un episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*. SD: desviación estándar.

		Control	Grove	1-Bueu	2-Bueu	3-Bueu	4-Bueu
<i>mrp1</i>	Media	1,00	,66	1,13	,99	2,00	2,04
	SD	,87	,54	,79	,94	3,93	2,55
<i>mrp2</i>	Media	1,00	5,91	3,52	3,88	7,79	5,32
	SD	,70	7,60	2,94	3,14	12,14	5,37
<i>abcg2</i>	Media	1,00	1,37	1,33	1,61	1,64	3,04
	SD	,78	1,50	1,35	2,05	1,33	2,56

5.3.5.2.- Branquia.

Para el estudio de expresión en branquia los genes de referencia seleccionados para la normalización de los genes de la familia *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* fueron: *gapdh*, *cox1* y *rps4* (análisis realizado en el apartado 5.3.3.2.2 de resultados). Siguiendo el criterio de Ling y Salvaterra (2011) serían cuatro o siete los genes de referencia necesarios para la normalización de los datos ya que la menor variación entre pares se obtuvo para $V_{4/5} = 0,170$ y $V_{7/8} = 0,149$ respectivamente. A pesar de ello, se emplearon tres genes de referencia (*gapdh*, *cox1* y *rps4*) por las mismas razones explicadas en el tejido de la glándula digestiva. Las tres primeras posiciones en la clasificación de los genes de referencia (Tabla 26) no varían entre los programas siendo a partir del cuarto gen cuando se observan discrepancias. Los resultados obtenidos para la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* no difieren mucho si se emplean tres, cuatro o cinco genes de referencia (Figura 49).

Los genes de referencia empleados en el experimento presentaron un amplio rango de niveles de expresión con el valor de *Cq* más bajo (14,9) presente en el gen *cox1* y el más alto (30,8) en el gen *act*. Los niveles de expresión para los genes de interés (*mrp1*, *mrp2* y *abcg2*) variaron desde un valor de *Cq* de 24,7 correspondiente al gen *mrp1* hasta 35,4 para el gen *mrp2* (Figura 50).

Las diferencias estadísticas entre el grupo control y los diferentes muestreos a lo largo del episodio tóxico (Grove, 1-Bueu, 2-Bueu, 3-Bueu y 4-Bueu) fueron calculadas con el test Dunnett del programa estadístico IBM SPSS 19. Los valores de la expresión normalizada de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* en los diferentes muestreos aparecen reflejados en la Figura 51.

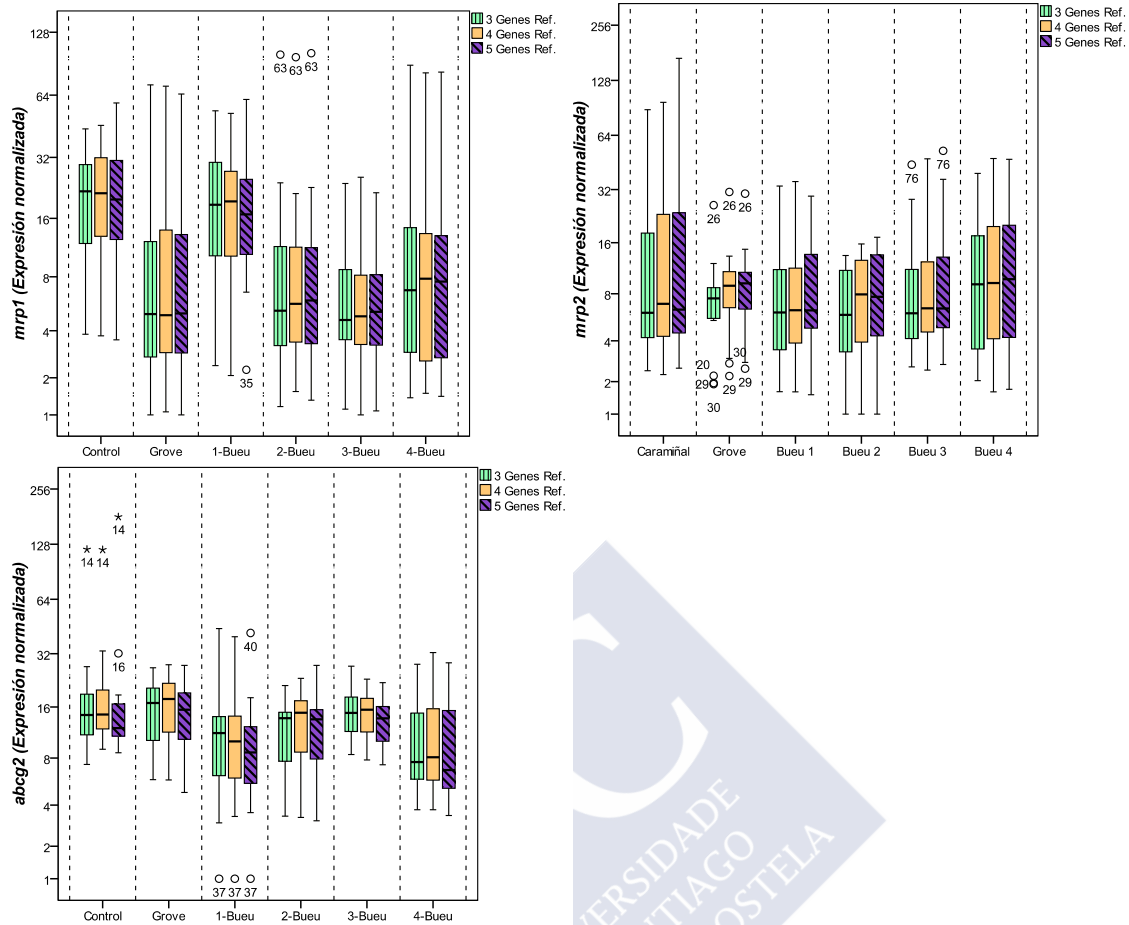


Figura 49. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de la expresión normalizada (en escala logarítmica base 2) empleando 3, 4 ó 5 genes de referencia en branquia de *Mytilus galloprovincialis* para los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2*. Los genes de referencia empleados son: 3 Genes Ref. (*gapdh*, *rps4* y *cox1*), 4 Genes Ref. (*gapdh*, *rps4*, *cox1* y *act*) y 5 Genes Ref. (*gapdh*, *rps4*, *cox1*, *act* y *rps27*). La línea central de la caja indica la mediana, la línea superior e inferior indica los percentiles 25 y 75 respectivamente, los bigotes superior e inferior corresponden a los valores máximo y mínimo.

El análisis de varianza de los valores de expresión normalizada en logaritmo base 2 de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* presentaron diferencias significativas para los genes *mrp1* ($p = 0,001$) y *abcg2* ($p = 0,030$) pero no para el gen *mrp2* ($p = 0,556$) (Tabla 37). Para determinar entre que muestreos se encuentran las diferencias se utilizó el test Dunnett. Los datos obtenidos muestran que el gen *mrp1* mostró diferencias significativas entre el grupo control y los muestreos Grove ($p = 0,011$), 2-Bueu ($p = 0,024$) y 3-Bueu ($p = 0,007$). El gen *abcg2* sólo presentó diferencias significativas entre el grupo control y 1-Bueu ($p = 0,035$). El gen *18S* mostró diferencias significativas entre el control y 4-Bueu ($p = 0,031$) (Figura 51 y Tabla 38).

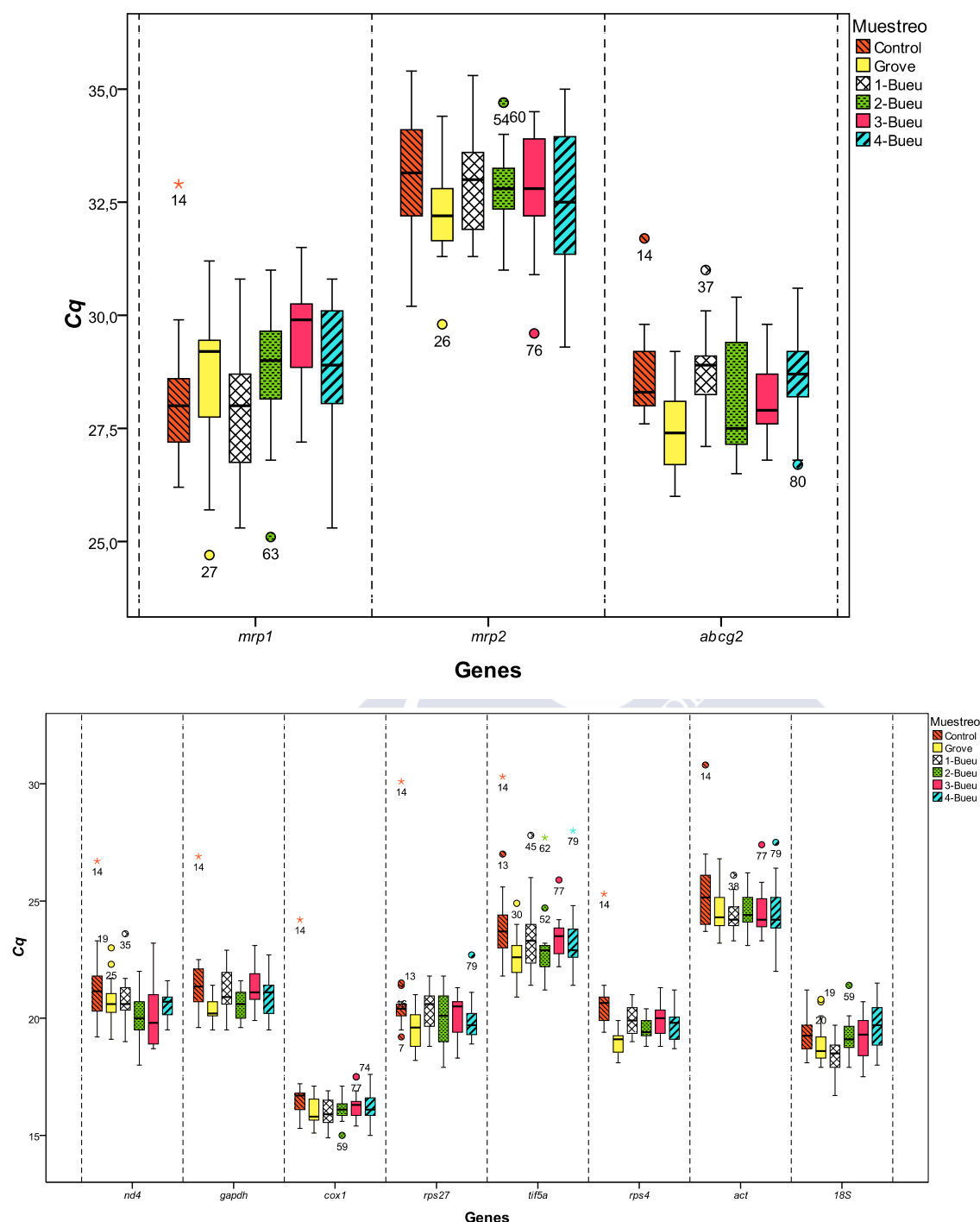


Figura 50. Diagrama de cajas y bigotes de los valores de *Cq* para los genes empleados en el estudio de expresión de muestras de *Mytilus galloprovincialis* a lo largo del episodio tóxico por *Dinophysis acuminata* en branquia. La línea central de la caja indica la mediana, la línea superior e inferior indica los percentiles 25 y 75 respectivamente, los bigotes superior e inferior corresponden a los valores máximo y mínimo.

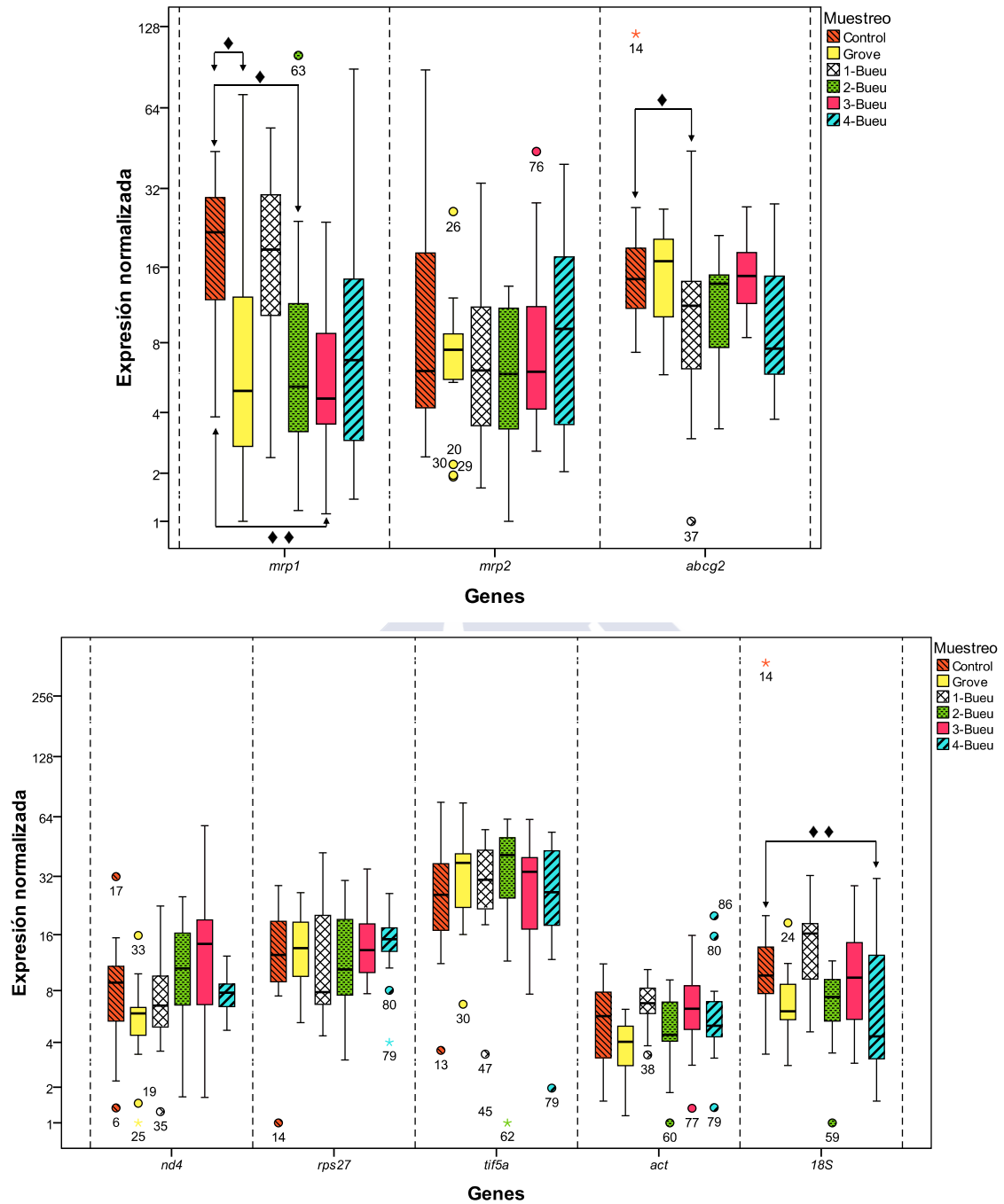


Figura 51. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de la expresión normalizada (en escala logarítmica base 2) de los genes en branquia para las muestras de *Mytilus galloprovincialis* recogidas durante un episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*. La línea central de la caja indica la mediana, la línea superior e inferior indica los percentiles 25 y 75 respectivamente, los bigotes superior e inferior corresponden a los valores máximo y mínimo. Test Dunnett: (♦) la diferencia es significativa a nivel $p \leq 0,035$, (♦♦) la diferencia es significativa a nivel $p \leq 0,007$.

Tabla 37. Análisis de varianza (ANOVA) de los diferentes genes en las muestras de *Mytilus galloprovincialis* en branquia. gl: grados de libertad; F: estadístico F de ANOVA.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Valor p
mrp1	Inter-grupos	46,899	5	9,380	4,472	,001
	Intra-grupos	182,482	87	2,097		
	Total	229,380	92			
mrp2	Inter-grupos	6,848	5	1,370	,796	,556
	Intra-grupos	149,777	87	1,722		
	Total	156,625	92			
abcg2	Inter-grupos	9,842	5	1,968	2,608	,030
	Intra-grupos	65,677	87	,755		
	Total	75,519	92			
nd4	Inter-grupos	12,597	5	2,519	2,299	,052
	Intra-grupos	95,330	87	1,096		
	Total	107,927	92			
rps27	Inter-grupos	1,864	5	,373	,505	,772
	Intra-grupos	64,255	87	,739		
	Total	66,119	92			
tif5a	Inter-grupos	1,573	5	,315	,228	,950
	Intra-grupos	120,271	87	1,382		
	Total	121,844	92			
act	Inter-grupos	6,748	5	1,350	2,245	,057
	Intra-grupos	52,295	87	,601		
	Total	59,043	92			
18S	Inter-grupos	19,537	5	3,907	3,405	,007
	Intra-grupos	99,844	87	1,148		
	Total	119,381	92			

Tabla 38. Comparaciones múltiples *a posteriori* con el test Dunnett de los diferentes genes en las muestras de *Mytilus galloprovincialis* en branquia durante un episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*.

Variable dependiente	(I) Muestreo	(J) Muestreo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Valor <i>p</i>	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
<i>mrp1</i>	Grove	Control	-1,5826*	,5063	,011	-2,885	-,280
	1-Bueu	Control	-,1879	,5063	,996	-1,490	1,115
	2-Bueu	Control	-1,4452*	,5063	,024	-2,748	-,143
	3-Bueu	Control	-1,8199*	,5063	,003	-3,122	-,517
	4-Bueu	Control	-12,412	,5063	,067	-2,544	,061
<i>abcg2</i>	Grove	Control	-,1933	,3038	,958	-,975	,588
	1-Bueu	Control	-,8247*	,3038	,035	-1,606	-,043
	2-Bueu	Control	-,5467	,3038	,268	-1,328	,235
	3-Bueu	Control	-,1193	,3038	,995	-,901	,662
	4-Bueu	Control	-,7753	,3038	,053	-1,557	,006
18S	Grove	Control	-,8633	,3745	,095	-1,827	,100
	1-Bueu	Control	,1540	,3745	,994	-,809	1,117
	2-Bueu	Control	-,8933	,3745	,079	-1,857	,070
	3-Bueu	Control	-,4173	,3745	,712	-1,381	,546
	4-Bueu	Control	-1,0307*	,3745	,031	-1,994	-,067

Como se observa en la Tabla 39, en branquia la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* no llega a ser superior a la media del control en ninguno de los muestreos.

Tabla 39. Expresión normalizada en relación al control (media del control = 1) de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* en branquia de *Mytilus galloprovincialis* durante un episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*. SD: desviación estándar.

		Control	Grove	1-Bueu	2-Bueu	3-Bueu	4-Bueu
<i>mrp1</i>	Media	1,00	,66	,96	,64	,32	,76
	SD	,53	1,01	,66	1,15	,27	1,12
<i>mrp2</i>	Media	1,00	,44	,53	,39	,60	,66
	SD	1,34	,33	,52	,24	,64	,59
<i>abcg2</i>	Media	1,00	,74	,59	,59	,75	,55
	SD	1,21	,31	,49	,26	,25	,38

5.3.5.3.- *Manto.*

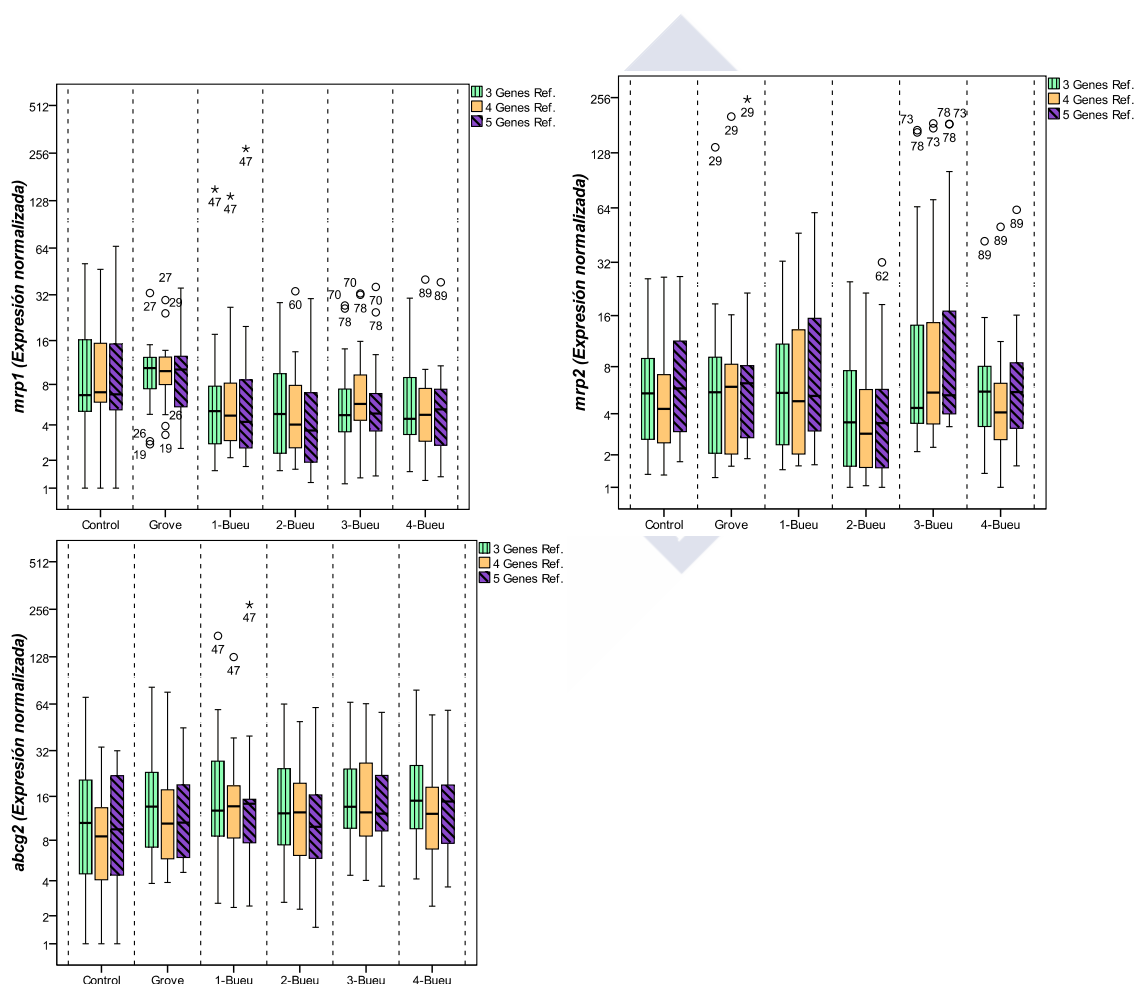


Figura 52. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de la expresión normalizada (en escala logarítmica base 2) empleando 3, 4 ó 5 genes de referencia en manto de *Mytilus galloprovincialis* para los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2*. Los genes de referencia empleados son: 3 Genes Ref. (*gapdh*, *rps4* y *rps27*), 4 Genes Ref. (*gapdh*, *rps4*, *rps27* y *18S*) y 5 Genes Ref. (*gapdh*, *rps4*, *rps27*, *18S* y *tif5a*). La línea central de la caja indica la mediana, la línea superior e inferior indica los percentiles 25 y 75 respectivamente, los bigotes superior e inferior corresponden a los valores máximo y mínimo.

Los niveles de expresión correspondientes a los valores de *Cq* variaron en los genes de referencia desde el valor de *Cq* más bajo (14,3) correspondiente al gen *cox1* hasta el más alto (29,6) en el gen *act*. Los genes de interés (*mrp1*, *mrp2* y *abcg2*) presentaron niveles de expresión que variaron desde un valor de *Cq* de 24,2 en el gen *abcg2* hasta 35,9 para el gen *mrp2* (Figura 53).

El análisis de varianza realizado con el programa estadístico IBM SPSS 19 calculó las diferencias estadísticas entre el grupo control y los muestreos durante el episodio tóxico. La Figura 54 muestra los valores de la expresión normalizada de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* en los diferentes muestreos. Los resultados obtenidos muestran que ninguno de los genes de interés empleados en este estudio presenta diferencias, únicamente el gen *act* muestra diferencias significativas ($p = 0,000$) (Tabla 40). El gen *act* mostró diferencias significativas entre el grupo control y los muestreos 1-Bueu ($p = 0,041$), 2-Bueu ($p = 0,001$) y 3-Bueu ($p = 0,039$) (Figura 54 y Tabla 41).

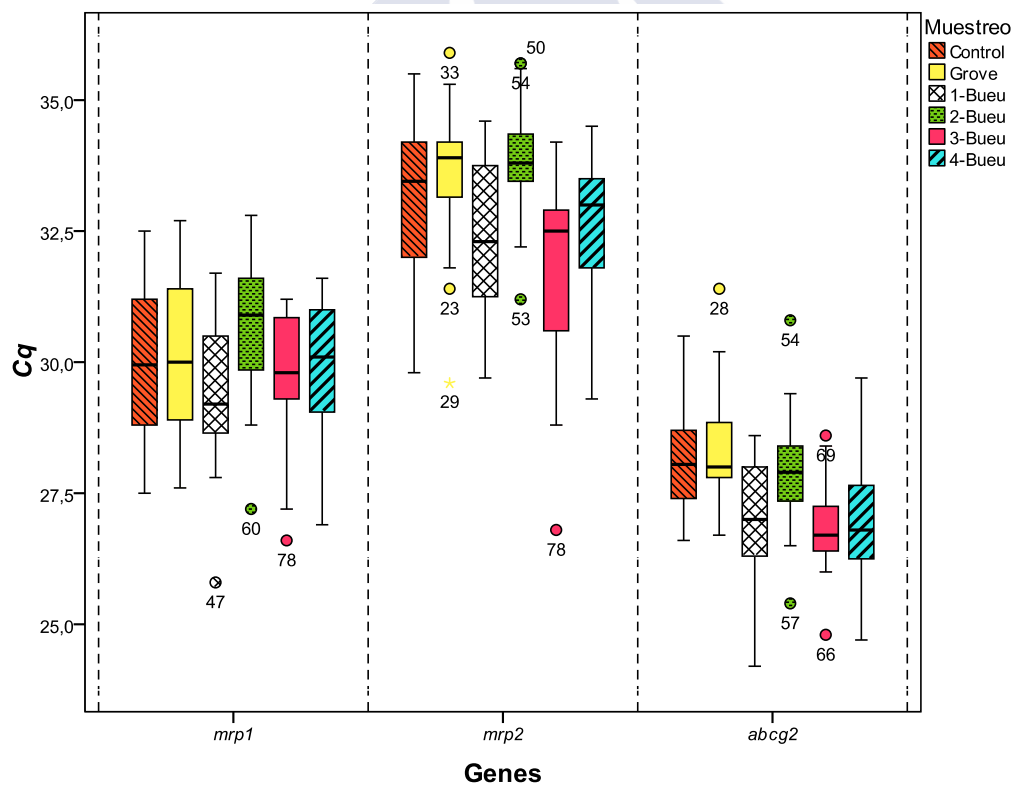


Figura 53. Diagrama de cajas y bigotes de los valores de *Cq* para los genes empleados en el estudio de expresión de muestras de *Mytilus galloprovincialis* a lo largo del episodio tóxico por *Dinophysis acuminata* en manto. La línea central de la caja indica la mediana, la línea superior e inferior indica los percentiles 25 y 75 respectivamente, los bigotes superior e inferior corresponden a los valores máximo y mínimo.

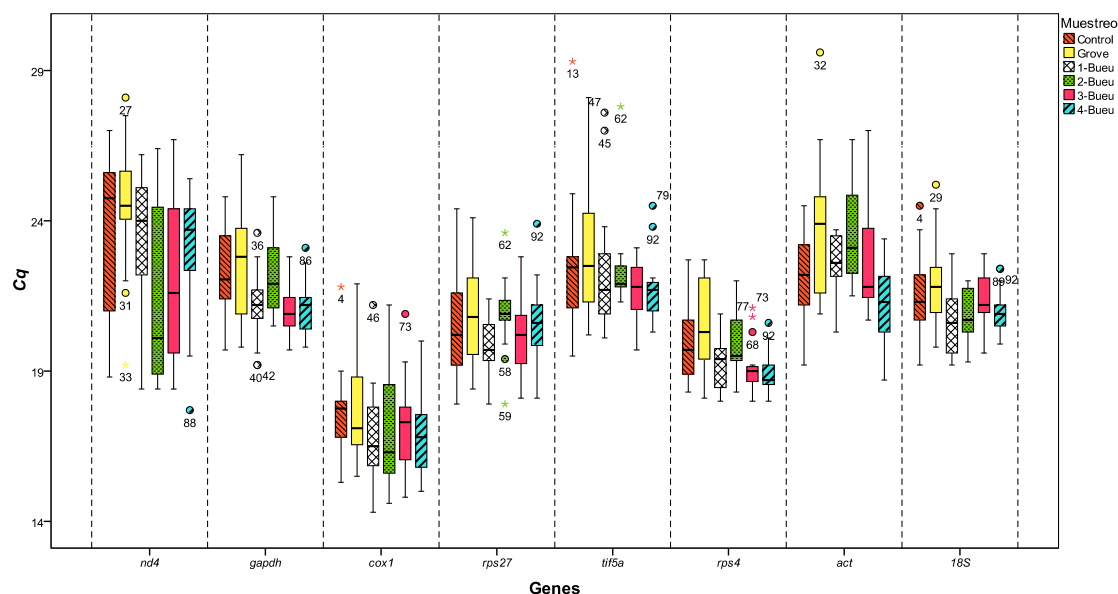


Figura 53 (continuación)

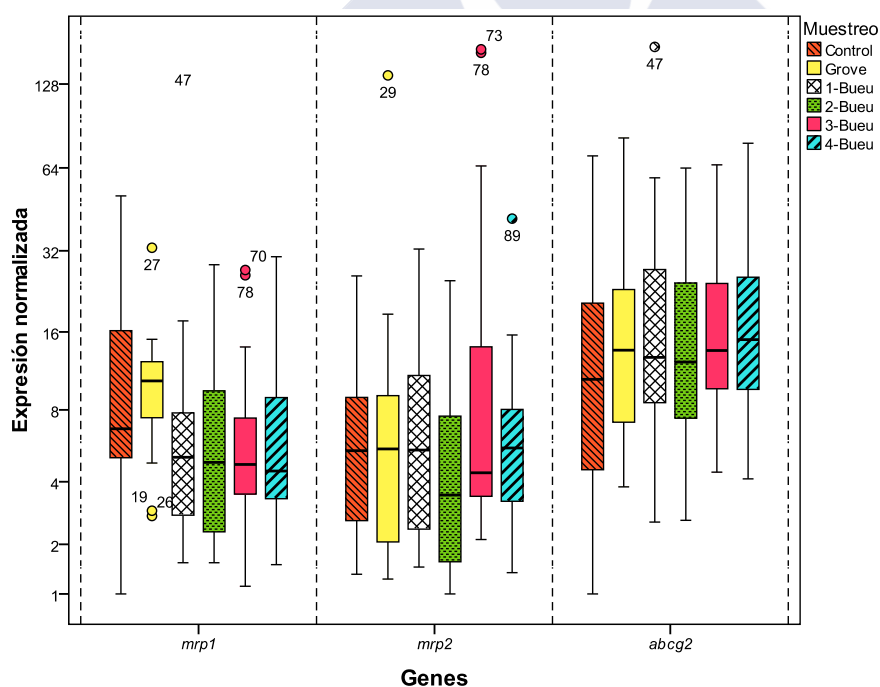


Figura 54. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de la expresión normalizada (en escala logarítmica base 2) de los genes en manto para las muestras de *Mytilus galloprovincialis* recogidas durante un episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*. La línea central de la caja indica la mediana, la línea superior e inferior indica los percentiles 25 y 75 respectivamente, los bigotes superior e inferior corresponden a los valores máximo y mínimo. Test Dunnett: (♦) la diferencia es significativa a nivel $p \leq 0,041$, (♦♦) la diferencia es significativa a nivel $p \leq 0,001$.

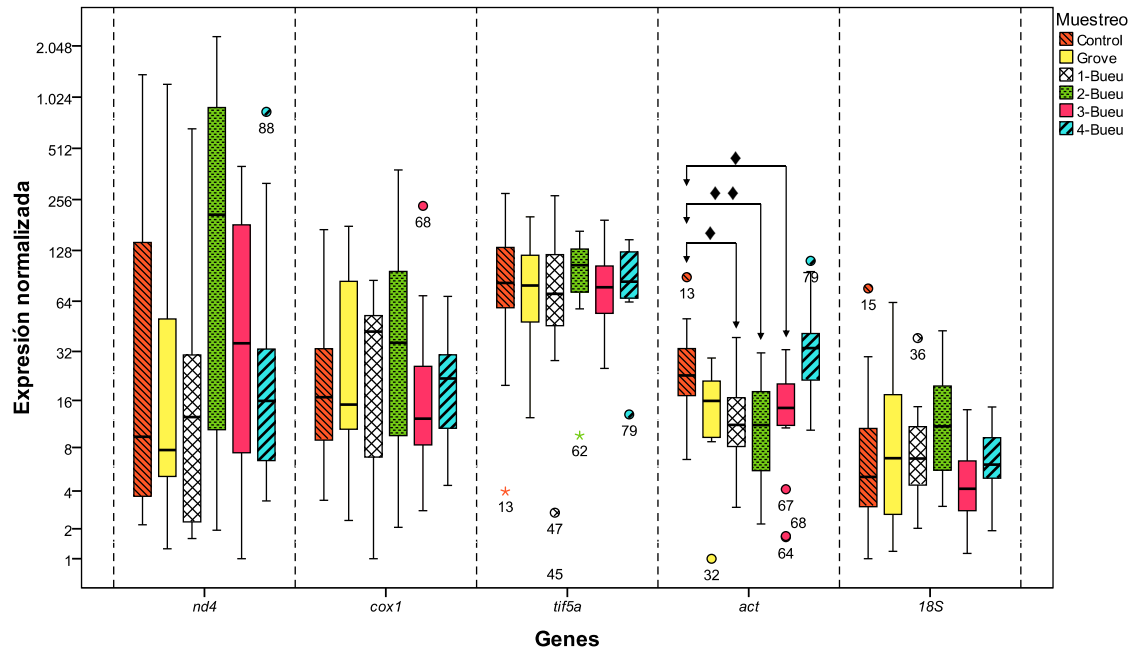


Figura 54 (continuación)

Tabla 40. Análisis de varianza (ANOVA) de los diferentes genes en las muestras de *Mytilus galloprovincialis* en manto. gl: grados de libertad; F: estadístico F de ANOVA.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Valor p
<i>mrp1</i>	Inter-grupos	9,238	5	1,848	1,002	,421
	Intra-grupos	160,386	87	1,844		
	Total	169,624	92			
<i>mrp2</i>	Inter-grupos	12,791	5	2,558	1,023	,409
	Intra-grupos	217,580	87	2,501		
	Total	230,371	92			
<i>abcg2</i>	Inter-grupos	4,358	5	,872	,472	,796
	Intra-grupos	160,777	87	1,848		
	Total	165,135	92			
<i>nd4</i>	Inter-grupos	67,452	5	13,490	1,567	,178
	Intra-grupos	749,031	87	8,610		
	Total	816,483	92			
<i>cox1</i>	Inter-grupos	9,800	5	1,960	,620	,685
	Intra-grupos	274,878	87	3,160		
	Total	284,678	92			
<i>tif5a</i>	Inter-grupos	7,031	5	1,406	,839	,526
	Intra-grupos	145,891	87	1,677		
	Total	152,922	92			
<i>act</i>	Inter-grupos	35,432	5	7,086	6,230	,000
	Intra-grupos	98,958	87	1,137		
	Total	134,391	92			
<i>18S</i>	Inter-grupos	15,062	5	3,012	1,875	,107
	Intra-grupos	139,797	87	1,607		
	Total	228,342	86			

Tabla 41. Comparaciones múltiples *a posteriori* con el test Dunnett de los diferentes genes en las muestras de *Mytilus galloprovincialis* en manto durante un episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*.

(I) Muestreo	(J) Muestreo	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Valor <i>p</i>	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Grove	Control	-,8939	,3729	,077	-1,853	,065
1-Bueu	Control	-1,0452*	,3729	,027	-2,004	-,086
1-Bueu	Control	-1,2079*	,3729	,008	-2,167	-,249
1-Bueu	Control	-1,0279*	,3729	,031	-1,987	-,069
1-Bueu	Control	,4454	,3729	,655	-,514	1,405

En manto, la expresión del gen *mrp1* y *abcg2* es superior a la media del control al inicio del episodio tóxico (1-Bueu) y a lo largo de todo el episodio respectivamente. Para el gen *mrp2*, la expresión es superior a la media del control en la mayoría de los muestreos, siendo más de 4 veces superior en el muestreo 3-Bueu (Tabla 42), pero en ninguno de los casos hay diferencias significativas.

Tabla 42. Expresión normalizada en relación al control (media del control = 1) de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* en manto de *Mytilus galloprovincialis* durante un episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*. SD: desviación estándar.

		Control	Grove	1-Bueu	2-Bueu	3-Bueu	4-Bueu
<i>mrp1</i>	Media	1,00	,90	1,31	,59	,65	,59
	SD	1,11	,59	3,12	,59	,68	,60
<i>mrp2</i>	Media	1,00	2,04	1,24	,85	4,29	1,10
	SD	,92	4,63	1,30	,98	7,82	1,36
<i>abcg2</i>	Media	1,00	1,13	1,62	1,10	1,18	1,22
	SD	1,11	1,19	2,48	,98	1,06	1,08

5.4.- DISCUSIÓN.

Los resultados agrupados en este capítulo son un ejemplo de la combinación de diferentes técnicas moleculares empleadas para estudiar la expresión de los genes que codifican para proteínas de las subfamilias ABCC y ABCG entre tejidos y a lo largo de un episodio tóxico.

Desde finales de junio hasta mediados de septiembre de 2010, los mejillones presentaron siempre ácido okadaico en las tres profundidades muestreadas, con una serie de máximos y mínimos de concentración de esta toxina que se debe a las

poblaciones de las especies de *Dinophysis* dominantes: *D. acuminata* y en menor grado de *D. caudata*. La temporada de afloramiento de *D. acuminata* ocurre entre marzo y septiembre. El incremento de las poblaciones se registra a finales de marzo y principios de abril asociado con una mayor insolación, el incremento de la temperatura superficial y la estabilidad de la columna de agua por la formación de marcadas picnoclinas. Los menores niveles de ácido okadaico detectados en los muestreos Grove, 1-Bueu y 4-Bueu se relacionan con los estadios iniciales y finales de la proliferación de *D. acuminata*. La distribución vertical de ácido okadaico en los mejillones a distintas profundidades se debe posiblemente a la migración vertical de las células de *D. acuminata* en la columna de agua debido a sus ritmos circadianos, pero también pueden estar relacionados con la meteorología, la estructura térmica de la columna de agua y las especies acompañantes (Lassus *et al.*, 1990; Reguera *et al.*, 1993). En los muestreos 1-Bueu y 3-Bueu, las diferencias observadas entre la concentración de ácido okadaico en superficie en relación con las capas inferiores sugiere que las células se congregaban en las capas inferiores, pues de lo contrario la distribución vertical de ácido okadaico habría sido más homogénea.

En cuanto al número de genes de referencia que se deben usar, son diversos los trabajos en expresión génica mediante RT-qPCR que han empleado un único gen. Muchos de los genes considerados como invariables pueden presentar variaciones interindividuales que provoquen una medida errónea cuando la expresión del gen de interés se normaliza frente a un solo gen de referencia. No existe un gen de referencia universal ya que son muchos los parámetros que pueden alterar su expresión, por esta razón, en este estudio se han realizado análisis previos de la estabilidad de los genes que se quieren usar empleando tres métodos: el de Vandesompele *et al.* (2002), Andersen *et al.* (2004) y Pfaffl *et al.* (2004). En este trabajo se realizaron dos análisis por separado. El primero para seleccionar el grupo de genes de referencia estable para comparar la expresión de los genes de interés entre tejidos (glándula digestiva, branquia y manto); y un segundo análisis determinó la estabilidad de los genes de referencia en el grupo de muestras pertenecientes a un mismo tejido, incluyendo aquí muestras con y sin toxina.

El primer análisis realizado de la estabilidad de los genes de referencia, empleando los tres métodos, para el estudio de la expresión génica entre tejidos permitió la normalización de la expresión frente a un grupo común de genes: *gapdh*, *rps4*, *rps27* y *cox1*. El segundo análisis realizado obtuvo series de estabilidad muy parecidas con los diferentes métodos que permitieron determinar los genes normalizadores para cada tejido: en glándula digestiva (*gapdh*, *rps4* y *cox1*), en branquia (*gapdh*, *rps4* y *cox1*) y en manto (*gapdh*, *rps27* y *rps4*). Cabe destacar la coincidencia del grupo de genes (*gapdh*, *rps4* y *cox1*) seleccionados para la

normalización de muestras de glándula digestiva y branquia. Sin embargo, para el tejido de manto la serie de genes es casi idéntica a excepción del gen *rps27* en manto y de *cox1* en glándula digestiva y branquia.

En los últimos años se han realizado diversos trabajos relacionados con la selección de genes de referencia en organismos acuáticos. En el presente trabajo, el gen *gapdh* mostró la menor variabilidad dentro de cada tejido y entre tejidos. Esta estabilidad del gen ha sido descrita recientemente en un estudio realizado para seleccionar genes de referencia en la gónada masculina de *Pecten maximus* (Mauriz *et al.*, 2012), así como en tejidos de la ostra *Crassostrea gigas* (Dheilly *et al.*, 2011) y en hemocitos de *Ostrea edulis* (Morga *et al.*, 2010). El número mínimo de genes de referencia a usar para que la normalización sea precisa es controvertido. Vandesompele *et al.* (2002) proponen un mínimo de tres genes de referencia para una correcta normalización de la expresión del gen de interés. También se tuvo en cuenta el criterio de Ling y Salvaterra (2011) que sugieren que el número de genes a usar se basa en el valor más bajo obtenido para las variaciones entre pares ($V_{n/n+1}$). En este estudio se emplearon cuatro genes de referencia (*gapdh*, *rps4*, *rps27* y *cox1*) para comparar la expresión de los genes de interés entre tejidos y tres genes de referencia para cada tejido individualmente: *gapdh*, *rps4* y *cox1* en glándula digestiva, *gapdh*, *rps4* y *cox1* en branquia y *gapdh*, *rps27* y *rps4* en manto. El uso de este número de genes se basa en la clasificación resultante de los análisis de estabilidad que muestra pocas variaciones entre las tres primeras posiciones mientras que a partir del cuarto gen se observan discrepancias en la clasificación con los programas *geNorm*, *NormFinder* y *BestKeeper*. Además, el análisis llevado a cabo empleando tres, cuatro o cinco genes de referencia para la normalización de los genes de estudio no mostraron diferencias significativas entre los resultados de expresión.

Los organismos acuáticos están constantemente expuestos a multitud de contaminantes antropogénicos o toxinas de origen natural presentes en el medio acuático, de manera que un sistema celular de defensa frente a tóxicos es importante. Los transportadores ABC, pertenecientes al sistema MXR, funcionan como una primera línea de defensa celular disminuyendo la acumulación intracelular y los efectos tóxicos de los xenobióticos. Los principales sitios de expresión de estos transportadores son tejidos implicados en la absorción, metabolismo y eliminación de xenobióticos y función de barrera. Partiendo de esta afirmación, este trabajo se ha centrado en el estudio de la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* en tres tejidos de mejillón empleando la metodología de la qPCR.

Los resultados revelaron diferencias significativas en la expresión de los genes entre los distintos tejidos. El mayor nivel de expresión para los genes pertenecientes a la

subfamilia ABCC (*mrp1* y *mrp2*) correspondió a glándula digestiva seguido de branquia y manto. En cuanto al gen *abcg2*, curiosamente los menores niveles de expresión se observaron en glándula digestiva y fue en manto donde se obtuvo una mayor expresión. La elevada expresión en glándula digestiva podría estar relacionada con su función metabólica y de eliminación de xenobióticos, siendo un tejido de desintoxicación implicado tanto en la síntesis de enzimas digestivas como en la desintoxicación de xenobióticos. Las proteínas MRP y ABCG están implicadas en la Fase III de desintoxicación y sus sustratos son productos del metabolismo de la Fase I y II, predominantemente presentes en forma de conjugados de glutatión, glucoronato y sulfato. De modo que, los altos niveles de expresión encontrados para ambos genes *abcc* en la glándula digestiva de mejillón confirman su papel en la desintoxicación. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre para la subfamilia ABCC, el gen *abcg2* presenta una expresión muy baja en este tejido. Estos resultados podrían estar relacionados con el hecho de que el sistema MXR en invertebrados marinos está formado por diferentes tipos de transportadores que funcionan conjuntamente, o bien, la existencia en mejillón de varios genes de tipo *abcg2* como ocurre en otros invertebrados (Annilo *et al.*, 2006; Goldstone *et al.*, 2006; Sturm *et al.*, 2009; Gökirmak *et al.*, 2012). No obstante, las branquias y manto participan en muchas funciones biológicas incluyendo la respiración y secreción, actuando como barreras entre el organismo y el medio externo. Las branquias, por su gran superficie y constante contacto con el medio acuático, funcionan como un órgano de barrera controlando la entrada de nutrientes y xenobióticos procedentes del medio externo. Los resultados de una expresión moderada obtenida para los tres genes en este tejido concuerdan con su posible papel como una primera línea de defensa. Algunos transportadores, como la proteína P-gp (MDR1/ABCB1), eliminan por unión y excreción directa los xenobióticos no metabolizados previniendo su acumulación intracelular actuando principalmente en la Fase 0 del mecanismo de desintoxicación.

En este contexto, diversos estudios sobre los genes *abc* han revelado la existencia de un patrón similar de expresión al obtenido en este estudio. Este patrón se focaliza en aquellos tejidos relacionados con la secreción, absorción y función de barrera. Lüdeking y Köhler (2002) investigaron la expresión del gen *mrp2* en *Mytilus edulis*. Este gen mostró un patrón de expresión específico cuyos niveles de expresión más altos se encontraron en la glándula digestiva, menor en branquias y bajo en manto y músculo. Cai *et al.* (2003) analizaron mediante *Northern blot* la distribución de la proteína Mrp2 en la raya *Raja erinacea*. Sus resultados indicaron que esta proteína estaba altamente expresada en hígado, intestino y riñón. Luckenbach y Epel (2008) estudiaron la expresión de los transportadores ABCB y ABCC en branquias de *M. californianus* localizándose en células apicales de los filamentos branquiales, región de

las branquias que está directamente en contacto con las corrientes de agua (Luckenbach y Epel, 2008). Kingtong *et al.* (2007) caracterizaron la expresión y localización de los transportadores ABC (MDR1, MRP1 y ABCG) en la ostra *Saccostrea forskali*. El estudio demostró la expresión de estas proteínas en los tejidos de desintoxicación (glándula digestiva, branquia y manto). En concreto, MDR1 presentó una localización apical en el epitelio de branquia y glándula digestiva, y en células basales del manto. Por su parte, MRP1 se expresó en el eje y en las células situadas en la superficie de las branquias, en las células basales del manto y en la glándula digestiva. Por último, la proteína ABCG se halló en las células que recubren los ejes de las branquias, en las células basales del manto y en la capa epitelial del tracto digestivo (Kingtong *et al.*, 2007). Loncar *et al.* (2010) analizaron la expresión de una serie de genes de transportadores ABC (*abcb1*, *abcb11*, *abcc1*, *abcc2*, *abcc3*, *abcc4*, *abcc5* y *abcg2*) en diferentes tejidos de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*. La expresión del gen *abcb1* fue alta en todos los tejidos analizados y baja para el gen *abcc5*. La expresión de *abcc1* y *abcc3* fue alta en riñón mientras que el gen *abcc4* además del riñón, la gónada también mostró niveles altos de expresión. El gen *abcg2* se expresó con niveles altos en la gónada y también en la parte distal del intestino, hígado, riñón y cerebro; en branquias y parte proximal del intestino los valores que obtuvieron fueron muy bajos situación similar a la que se observa en mejillón en el que la expresión de *abcg2* es mayor en el manto, donde tiende a ubicarse la mayor parte del tejido gonadal.

Asimismo, en la trucha arco iris Fischer *et al.* (2011) cuantificaron los niveles de varios transcritos de transportadores ABC en diferentes líneas celulares. Los resultados que obtuvieron indicaron que todos los transcritos estaban presentes en todas las líneas celulares y que, generalmente, los genes de la subfamilia ABCC (*abcc1*, *abcc2* y *abcc3*) tenían una expresión más alta mientras que para los miembros de la subfamilia ABCB era más baja (Fischer *et al.*, 2011). Zaja *et al.* (2008b) hallaron una expresión elevada de la proteína ABCG2 en hígado y en hepatocitos de *Oncorhynchus mykiss*. En el pez cebra, *Danio rerio*, también se estudió la expresión de varios transportadores ABCC en larvas y en tejidos adultos. Durante el desarrollo, los genes *abcc2* y *abcc5* no se detectan hasta las 92 horas después de la fertilización, el gen *abcc1* por el contrario se detecta en todos los estadios larvarios. En tejidos adultos el gen *abcc1* y *abcc5* se expresa principalmente en testículos pero también en ovarios, ojo, intestino, riñón y cerebro mientras que el gen *abcc2* se expresa principalmente en órganos excretores como el hígado, el intestino y el riñón (Long *et al.*, 2011a, 2011b, 2011d). En cuanto a la familia ABCG, Zhou *et al.* (2009) determinaron el análisis espacial del gen *ABCG* en el camarón *Litopenaeus vannamei*. Este gen estaba significativamente más expresado en el hepatopáncreas que en cualquiera de los otros tejidos examinados (Zhou *et al.*, 2009). Shukle *et al.* (2008) evaluaron el patrón espacial y temporal del transcrito *white* en

tejidos y durante el desarrollo del mosquito *Mayetiola destructor*. El análisis espacial reveló altos niveles en los tubos de Malpighi que corresponde al sistema excretor y osmoregulador en los insectos. En cuanto al análisis temporal, durante el desarrollo los niveles más elevados correspondieron al segundo y tercer estadio larvario de desarrollo (Shukle *et al.*, 2008).

Los genes de referencia candidatos excluidos (*nd4*, *tif5a*, *act* y *18S*) muestran diferencias significativas entre los distintos tejidos descartándolos para llevar a cabo la normalización de los datos de expresión. Concretamente el gen *18S*, que ha sido tradicionalmente considerado como gen de expresión constante independientemente del tipo de muestras y por tanto usado ampliamente en muchos trabajos (Hamdoun *et al.*, 2004; Zucchi *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2011a, 2011d; de Cerio *et al.*, 2012; Della Torre *et al.*, 2012), es uno de los que muestra una mayor variabilidad entre los tres tejidos.

La hipótesis de partida de este trabajo se ha basado en dos premisas. Por un lado se conoce la existencia de un sistema MXR en organismos acuáticos y por otro lado se sabe que el ácido okadaico, toxina responsable de la intoxicación diarreica por moluscos (DSP), es sustrato de los transportadores ABC. Con estos dos indicios, este trabajo ha estudiado la posible relación entre los niveles de expresión de tres genes: *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* a lo largo del ciclo de intoxicación/desintoxicación de mejillones afectados por toxina DSP. Para ello, se analizaron los niveles de mRNA de los genes en tres tejidos de gran importancia para la excreción, el metabolismo, la absorción y función de barrera.

Los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron diferencias significativas en la expresión de los genes en los tejidos de glándula digestiva y branquia a lo largo del episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*. En relación al tejido de glándula digestiva sólo el gen *mrp2* presentó diferencias significativas, sobreexpresión en presencia de toxina DSP, entre el grupo control y los diferentes muestreos. En branquia los genes *mrp1* y *abcg2* presentaron diferencias entre el grupo control y los muestreos Grove, 2-Bueu y 3-Bueu para el gen *mrp1* y entre el grupo control y el muestreo 1-Bueu para el gen *abcg2*. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para ninguno de los tres genes en el tejido de manto. Cabe destacar, que los resultados presentados en este trabajo apoyan la existencia de una relación entre los niveles de mRNA del gen *mrp2* y la concentración de ácido okadaico en glándula digestiva.

Los organismos acuáticos, entre ellos los mejillones, durante los episodios nocivos de origen fitoplanctónico quedan expuestos a las toxinas y aparentemente no se observa un aumento en la mortalidad de sus poblaciones. Es obvio que, estos organismos expuestos de manera natural a las toxinas como el ácido okadaico, presenten mecanismos que los protejan de sus posibles efectos y eviten su acumulación

en el medio citosólico. Estudios previos en líneas celulares de vertebrados demuestran que el ácido okadaico es sustrato de la P-gp e induce su expresión confiriéndoles a las células resistencia, dicha resistencia, puede ser contrarrestada por la adición de verapamilo (inhibidor competitivo de la P-gp) (Yusa y Tsuruo, 1989; Tohda *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995; Ritz *et al.*, 1997). La exposición prolongada a bajas concentraciones de ácido okadaico promueve la formación de tumores (Suganuma *et al.*, 1988) mientras que la exposición de células a concentraciones altas o moderadas deriva en apoptosis (Bøe *et al.*, 1991; Lerga *et al.*, 1999). Algunas líneas celulares expuestas a concentraciones subtóxicas de ácido okadaico desarrollan resistencia y se observa un aumento en la expresión de proteínas P-gp (Chambers *et al.*, 1993; Ritz *et al.*, 1997; Sandal *et al.*, 2001). Manfrin *et al.* (2010) evaluaron el perfil de expresión génica inducida por la exposición al ácido okadaico en glándula digestiva de *M. galloprovincialis*. Se diferenciaron dos fases en la respuesta a la exposición, la primera caracterizada por el aumento del número de genes sobreexpresados debido a la activación de los mecanismos de defensa y/o adaptación fisiológica del mejillón a la toxina. En la segunda fase, el número de genes infraexpresados aumentaba debido a los posibles fallos en los diferentes procesos celulares provocados por los altos niveles de toxina. Más de la mitad de los genes sobreexpresados en el experimento tenían una función desconocida y aquellos genes, con función conocida, se ubicaban en tres categorías funcionales: estructura celular, apoptosis y estrés. Los hemocitos de *M. edulis* son resistentes al ácido okadaico y no expresan la “clásica” actividad de la P-gp en la membrana plasmática, sino que el principal sitio de actividad de la proteína es en la membrana de los lisosomas (Svensson *et al.*, 2003). Algo similar ocurre en el cangrejo *Carcinus maenas* donde la expresión de la proteína P-gp también está localizada en la membrana de los lisosomas de células F/B de la glándula digestiva (Köhler *et al.*, 1998).

Otros tipos de cianotoxinas, microcistis y cilindrospermopsinas son metabolizadas por enzimas de desintoxicación como la glutatión-S-transferasa y posteriormente eliminadas por proteínas del sistema MXR en diferentes organismos acuáticos, como en el pez *Danio rerio* (Pflugmacher *et al.*, 1998; Wiegand *et al.*, 1999; Pietsch *et al.*, 2001), en el crustáceo *Daphnia magna* (Pflugmacher *et al.*, 1998; Nogueira *et al.*, 2004) y en los moluscos *Mytilus galloprovincialis* (Vasconcelos *et al.*, 2007; Puerto *et al.*, 2011), *Dreissena polymorpha* (Pflugmacher *et al.*, 1998; Contardo-Jara *et al.*, 2008) y *Corbicula fluminea* (Puerto *et al.*, 2011). Varios estudios demuestran que las algas y el fitoplancton marino contienen compuestos que son sustratos de las proteínas del sistema MXR. Extractos del alga verde *Caulerpa taxifolia* inhiben la actividad de la P-gp en el mejillón *Dreissena polymorpha* (Schröder *et al.*, 1998), al igual que los extractos de otras algas (*Macrocystis pyrifera*, *Egria menziesii* y

Phyllospadix scouleri) y el fitoplancton (*Alexandrium catenella* y *Pseudonitzschia australis*) son sustratos y/o inhibidores de la P-gp en *M. californianus* (Eufemia *et al.*, 2002).

La presencia y la función de los transportadores ABC en invertebrados acuáticos ha sido confirmado por diferentes métodos (captación/unión de sustratos conocidos del transportador, inmunohistoquímica, transferencia *Western* y *Northern*, sensibilidad a inhibidores, etc.). En estudios anteriores a este, se ha observado la inducción de la actividad de transporte y el aumento de los niveles de proteínas MXR en poblaciones de organismos acuáticos expuestos a contaminantes en el medio natural o en laboratorio y en experimentos de trasplante entre zonas muy y poco contaminadas. Muchos estudios mostraron variaciones en la expresión de las proteínas MXR en diferentes experimentos de campo. *Mytilus edulis* y *Crassostrea gigas* (Minier *et al.*, 1993), *Mytilus galloprovincialis* (Kurelec, 1995b), *Crassostrea virginica* (Keppler y Ringwood, 2001) y *Monodonta turbinata* (Kurelec, 1995a, 1995b) presentan una mayor expresión de proteínas MXR en zonas contaminadas que en zonas no contaminadas. La actividad MXR también se estudió en el mejillón cebra *Dreissena polymorpha* procedente del medio natural y luego trasplantado a un medio libre de contaminantes en el laboratorio. Los resultados mostraron una reducción de la actividad MXR después de 8-9 días de depuración por lo tanto, el sistema de defensa se reducía cuando las condiciones del medio mejoran (Pain y Parant, 2007). No obstante, resultados similares en los que se induce el sistema MXR se han observado en organismos del medio natural y en laboratorio expuestos a contaminantes antropogénicos. Las proteínas ABC pueden ser inducidas tanto por (1) contaminantes orgánicos como: petróleo (Bard *et al.*, 2002b; Hamdoun *et al.*, 2002; Pain y Parant, 2003b; Venn *et al.*, 2009; de Cerio *et al.*, 2012; Della Torre *et al.*, 2012); hidrocarburos aromáticos (Bard *et al.*, 2002a); organoclorados (Minier *et al.*, 2006); agentes surfactantes (de Cerio *et al.*, 2012); plaguicidas (Eufemia y Epel, 2000); insecticidas (Kingtong *et al.*, 2007; Franzellitti *et al.*, 2011); herbicidas (Navarro *et al.*, 2012) y sustancias cancerígenas (Britvić y Kurelec, 1999; Lüdeking y Köhler, 2002; Luedeking *et al.*, 2005) como por (2) metales pesados: cadmio (Achard *et al.*, 2004; Ivanina y Sokolova, 2008; Zhou *et al.*, 2009; Zucchi *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2011a, 2011b, 2011c, 2011d); zinc (Achard *et al.*, 2004); níquel (Venn *et al.*, 2009; Franzellitti *et al.*, 2011); plomo y arseniato (Long *et al.*, 2011a, 2011b, 2011d); mercurio orgánico e inorgánico (Franzellitti y Fabbri, 2006; Bosnjak *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2011a, 2011b, 2011d; Navarro *et al.*, 2012) y cloruro de cadmio y arsenito sódico (Eufemia y Epel, 2000).

Ciertos factores naturales que no están relacionados con la contaminación también son responsables de la inducción del sistema MXR. Fluctuaciones en el pH

(ácido o alcalino) en el camarón *Litopenaeus vannamei* aumentan la expresión de la proteína ABCG2 en el hepatopáncreas (Zhou *et al.*, 2009). En *Mytilus edulis*, Luedeking y Koehler (2004) estudiaron la regulación de los genes del sistema MXR por factores ambientales. Observaron que se producían cambios en los niveles de los genes en relación a altas temperaturas, baja salinidad y anaerobiosis. Los mejillones *M. galloprovincialis* y *M. californianus* expuestos a un estrés físico como un choque térmico mostraron altos niveles de P-gp en comparación con aquellos mejillones mantenidos a temperatura ambiente (Eufemia y Epel, 2000; Minier *et al.*, 2000). Varios autores estudiaron la expresión de los genes *abc* frente a variaciones estacionales en el mejillón *Dreissena polymorpha* (Pain *et al.*, 2007) y en la ostra *Crassostrea virginica* (Keppler y Ringwood, 2001). Los resultados mostraron que la actividad MXR es mayor durante los meses de verano y menor en los meses más fríos, ello está relacionado con la temperatura del agua y la proliferación de algas.

Además de las diferencias significativas encontradas en la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* otros dos genes (*act* y *18S*) presentaron alteraciones en su expresión en tejidos de mejillón a lo largo del episodio tóxico por *Dinophysis acuminata*. Concretamente el gen *act* mostró diferencias significativas en los tejidos de glándula digestiva y manto mientras que, el gen *18S* presentó diferencias en branquia. La alteración de estos genes relacionados con la estructura celular y síntesis de proteínas podría deberse a la actividad del AO como inhibidor de la proteína fosfatasa PP2A y en menor medida la PP1. Estas enzimas están implicadas en procesos de desfosforilación de los residuos de fosfoserina y fosfotreonina de los sustratos proteicos y por tanto en la regulación del metabolismo celular, la replicación de DNA, la transcripción, la diferenciación o la señalización celular. Diversos estudios revelan que la presencia de AO provoca la pérdida de la organización del citoesqueleto, siendo la actina uno de sus tres componentes fundamentales (Svensson y Förlin, 1998; Manfrin *et al.*, 2010).

En resumen, podemos decir que los resultados derivados de este estudio proporcionan información muy útil para posteriores trabajos de expresión génica en tejidos de mejillón. No obstante, siempre es necesario evaluar la estabilidad de los genes de referencia en cada estudio que se realiza. Analizando de forma conjunta todos los resultados obtenidos, se puede pensar que los diferentes perfiles de expresión observados en el mejillón reflejan una distribución corporal y temporal de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* acorde con la mayoría de los estudios. Una vez que el xenobiótico entra en el citosol por difusión pasiva a través de la membrana celular son los transportadores del sistema MXR los que eliminan los metabolitos y disminuyen su concentración intracelular. La mayor expresión de los genes *mrp1* y *mrp2* en glándula digestiva concuerda con su participación en la Fase III del metabolismo de

xenobióticos, puesto que tiene lugar sobre todo en este tejido. Además el aumento significativo del nivel de expresión del gen *mrp2* en la glándula digestiva, en presencia de toxina causante de DSP, sugiere que la proteína está implicada en la Fase III del metabolismo del AO en glándula digestiva. En el caso de los genes *mrp1* y *abcg2* hay también un aumento de la expresión en la glándula digestiva en presencia de AO, pero dicho aumento no es estadísticamente significativo. En branquia se produce una disminución de la expresión de los tres genes (*mrp1*, *mrp2* y *abcg2*) en presencia de la toxina aunque en la mayor parte de los casos el descenso no es estadísticamente significativo para *mrp2* y *abcg2*. Y finalmente, en manto no hay una tendencia clara y las variaciones de expresión en presencia de la toxina no son nunca estadísticamente significativas.







6. CONCLUSIONES



A partir de los resultados que se han obtenido en la presente Tesis Doctoral pueden extraerse las siguientes conclusiones generales:

1.- Se ha obtenido la secuencia completa de los cDNA que codifican para tres proteínas transportadoras ABC en *Mytilus galloprovincialis*. Los análisis de similitud frente a otras secuencias presentes en las bases de datos indican que dos de ellas pertenecen a la subfamilia ABCC (MRP1 y MRP2) y una a la subfamilia ABCG (ABCG2). Las secuencias de los dos cDNA que codifican para las proteínas MRP1 y MRP2 presentan un tamaño de 4.648 pb y 5.065 pb y codifican para dos proteínas de 1.500 y 1.524 aminoácidos respectivamente. La secuencia del cDNA que codifica para la proteína ABCG2 está compuesta por 2.164 pb y codifica para una proteína de 635 aminoácidos.

2.- La identificación de los dominios conservados, la determinación de su topología en relación a la membrana y el análisis filogenético confirman que las proteínas MRP1 MRP2 son miembros de la subfamilia ABCC, presentando los motivos altamente conservados característicos de esta familia: Walker A, Walker B y motivo C así como una topología con tres dominios transmembrana típica de algunos miembros de la subfamilia ABCC.

3.- El análisis de los dominios conservados, la topología en relación a la membrana y el análisis filogenético determinaron que la tercera proteína es homóloga a la ABCG2 de humanos con los motivos conservados (Walker A, Walker B y motivo C) presentes en esta familia de transportadores ABC. Su topología muestra las características distintivas de esta subfamilia, consta de un dominio de unión a nucleótido en el extremo amino-terminal y un dominio transmembrana en el extremo carboxi-terminal cuya configuración es inversa al resto de los transportadores ABC.

4.- El análisis de estabilidad de los ocho genes de referencia candidatos ha permitido identificar los grupos de genes de referencia más estables para normalizar los datos de expresión para los tejidos estudiados, siendo:

- En los tres tejidos conjuntamente: *gapdh*, *rps27*, *rps4* y *cox1*.
- En glándula digestiva: *gapdh*, *rps4* y *cox1*.
- En branquia: *gapdh*, *rps4* y *cox1*.
- En manto: *gapdh*, *rps27* y *rps4*.

5.- El estudio de expresión comparando distintos tejidos muestra un perfil similar para los genes *mrp1* y *mrp2*. El nivel de expresión es significativamente mayor en glándula digestiva y branquia que en manto, lo que concuerda con el papel de estos tejidos en procesos de desintoxicación. El gen *abcg2* presenta un perfil diferente siendo su expresión significativamente mayor en el manto lo que podría sugerir una función protectora de la gónada.

6.- Se ha observado que la presencia de toxinas DSP induce de forma significativa la expresión del gen *mrp2* en glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*. En este tejido existe una tendencia clara de aumento en sus niveles de expresión a medida que aumenta la concentración de ácido okadaico, lo que concuerda con el papel de la glándula digestiva como órgano principal implicado en la biotransformación y eliminación de biotoxinas (Fases I, II y III del metabolismo de xenobióticos). En branquia y manto no se observó una inducción de la expresión de los genes *mrp1*, *mrp2* y *abcg2* en presencia de ácido okadaico. Esto se debe al papel de estos genes en la fase final de la desintoxicación de metabolitos ya conjugados, procesos que en mejillón tiene lugar fundamentalmente en la glándula digestiva.



7. BIBLIOGRAFÍA



- Achard, M., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P. 2004. Induction of a multixenobiotic resistance protein (MXR) in the Asiatic clam *Corbicula fluminea* after heavy metals exposure. *Aquat. Toxicol.*, 67: 347-357.
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C.G., Wechsler, S.W., Clement, J.P., Boyd, A.E., González, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., Nelson, D.A. 1995. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*, 268: 423-426.
- Aherne, G.W., Hardcastle, A., Valenti, M., Bryant, A., Rogers, P., Pettit, G.R., Srirangam, J.K., Kelland, L.R. 1996. Antitumour evaluation of dolastatins 10 and 15 and their measurement in plasma by radioimmunoassay. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 38: 225-232.
- Albentosa Verdú, M. 1992. La Acuicultura en el mundo. Volumen 19: Unidades Didácticas De Acuicultura. Xunta de Galicia, Consellería de Pesca Marisqueo e Acuicultura, Galicia.
- Albrecht, C., Viturro, E. 2007. The ABCA subfamily gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflugers Arch.*; 453: 581-589.
- Allikmets, R., Gerrard, B., Hutchinson, A., Dean, M. 1996. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum. Mol. Genet.*; 5: 1649-1655.
- Allikmets, R., Schriml, L.M., Hutchinson, A., Romano-Spica, V., Dean, M. 1998. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.*, 58: 5337-5339.
- Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M. 1999. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 39: 361-398.
- Ambudkar, S.V., Kim, I.W., Xia, D., Sauna, Z.E. 2006. The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Lett.*, 580: 1049-1055.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, 64: 5245-5250.
- Anderson, D.M., Sullivan, J.J., Reguera, B. 1989. Paralytic shellfish poisoning in northwest Spain: the toxicity of the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Toxicon*, 27: 665-674.
- Andrews, E.B. 1988. Excretory systems of molluscs. En Truman, E.R., Clarke, M.R. (Eds.), *The Mollusca*. Editorial Academic Press, New York, pp. 381-448.

- Andrews, E.B., Jennings, K.H. 1993. The anatomical and ultrastructural basis of primary urine formation in Bivalve Molluscs. *J. Mollus. Stud.*, 59: 223-257.
- Anjard, C., Loomis, W.F. 2002. Evolutionary analyses of ABC transporters of *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot. Cell*, 1: 643-652.
- Annilo, T., Chen, Z.Q., Shulenin, S., Costantino, J., Thomas, L., Lou, H., Stefanov, S., Dean, M. 2006. Evolution of the vertebrate ABC gene family: analysis of gene birth and death. *Genomics*, 88: 1-11.
- Annilo, T., Tammur, J., Hutchinson, A., Rzhetsky, A., Dean, M., Allikmets, R. 2001. Human and mouse orthologs of a new ATP-binding cassette gene, ABCG4. *Cytogenet. Cell Genet.*, 94: 196-201.
- Bakos, E., Evers, R., Szakács, G., Tusnády, G.E., Welker, E., Szabó, K., de Haas, M., van Deemter, L., Borst, P., Váradi, A., Sarkadi, B. 1998. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem.*, 273: 32167-32175.
- Bakos, E., Hegedüs, T., Holló, Z., Welker, E., Tusnády, G.E., Zaman, G.J., Flens, M.J., Váradi, A., Sarkadi, B. 1996. Membrane topology and glycosylation of the human multidrug resistance-associated protein. *J. Biol. Chem.*, 271: 12322-12326.
- Ballatori, N., Hammond, C.L., Cunningham, J.B., Krance, S.M., Marchan, R. 2005. Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 204: 238-255.
- Bandler, P.E., Westlake, C.J., Grant, C.E., Cole, S.P., Deeley, R.G. 2008. Identification of regions required for apical membrane localization of human multidrug resistance protein 2. *Mol. Pharmacol.*, 74: 9-19.
- Bard, S.M. 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 48: 357-389.
- Bard, S.M., Bello, S.M., Hahn, M.E., Stegeman, J.J. 2002a. Expression of P-glycoprotein in killifish (*Fundulus heteroclitus*) exposed to environmental xenobiotics. *Aquat. Toxicol.*, 59: 237-251.
- Bard, S.M., Woodin, B.R., Stegeman, J.J. 2002b. Expression of P-glycoprotein and cytochrome P450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpureus*) exposed to environmental contaminants. *Aquat. Toxicol.*, 60: 17-32.
- Bardales, J.R. 2007. Isoformas de la proteína quinasa dependiente de AMPc en el molusco bivalvo *Mytilus galloprovincialis*. Purificación, caracterización funcional y distribución tisular. Tesis Doctoral. USC.

- Bates, H.A., Kostriken, R., Rapoport, H. 1978. The occurrence of saxitoxin and other toxins in various dinoflagellates. *Toxicon*, 16: 595-601.
- Bates, S.S., Bird, C.J., de Freitas, A.S.W., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L.A., Johnson, G.R., McCulloch, A.W., Odense, P., Pocklington, R., Quilliam, M.A., Sim, P.G., Smith, J.C., Subba Rao, D.V., Todd, E.C.D., Walter, J.A., Wright, J.L.C. 1989. Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from eastern Prince Edward Island, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 1203-1215.
- Bauder, A.G., Cembella, A.D., Bricelj, V., Quilliam, M.A. 2001. Uptake and fate of diarrhetic shellfish poisoning toxins from the dinoflagellate *Prorocentrum lima* in the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 213: 39-52.
- Beaudet, L., Gros, P. 1995. Functional dissection of P-glycoprotein nucleotide-binding domains in chimeric and mutant proteins. Modulation of drug resistance profiles. *J. Biol. Chem.*, 270: 17159-17170.
- Beaumont, A.R., Matin-Abdul, A.K.M. 1994. Differences in morphology, survival and size between self- and cross-fertilized larvae of *Mytilus galloprovincialis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 74: 445-448.
- Belfield, G.P., Ross-Smith, N.J., Tuite, M.F. 1995. Translation elongation factor-3 (EF-3): an evolving eukaryotic ribosomal protein? *J. Mol. Evol.*, 41: 376-387.
- Belinsky, M.G., Bain, L.J., Balsara, B.B., Testa, J.R., Kruh, G.D. 1998. Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 1735-1741.
- Belinsky, M.G., Chen, Z.S., Shchaveleva, I., Zeng, H., Kruh, G.D. 2002. Characterization of the drug resistance and transport properties of multidrug resistance protein 6 (MRP6, ABCC6). *Cancer Res.*, 62: 6172-6177.
- Belinsky, M.G., Kruh, G.D. 1999. MOAT-E (ARA) is a full-length MRP/cMOAT subfamily transporter expressed in kidney and liver. *Br. J. Cancer*, 80: 1342-1349.
- Benabdelhak, H., Schmitt, L., Horn, C., Jumel, K., Blight, M.A., Holland, I.B. 2005. Positive co-operative activity and dimerization of the isolated ABC ATPase domain of HlyB from *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, 386: 489-495.
- Bera, T.K., Iavarone, C., Kumar, V., Lee, S., Lee, B., Pastan, I. 2002. MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 6997-7002.
- Bera, T.K., Lee, S., Salvatore, G., Lee, B., Pastan, I. 2001. MRP8, a new member of ABC transporter superfamily, identified by EST database mining and gene prediction program, is highly expressed in breast cancer. *Mol. Med.*, 7: 509-516.

- Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., Hobbs, H.H. 2000. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*, 290: 1771-1775.
- Bialojan, C., Takai, A. 1988. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem. J.*, 256: 283-290.
- Blanco, J., Fernández, M., Mariño, J., Reguera, B., Míguez, A., Maneiro, J., Cacho, E., Martínez, A. 1995. From *Dinophysis* spp. toxicity to DSP outbreaks: a preliminary model of toxin accumulation in mussels. En Lassus, P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Editorial Lavoisier, Paris, pp. 777-782.
- Blanco, J., Moroño, A., Franco, J., Reyero, M.I. 1997. PSP detoxification kinetics in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. One- and two-compartment models and the effect of some environmental variables. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 58: 165-175.
- Blanco, J., Fernández, M.L., Míguez, A., Moroño, A. 1999. Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 176: 153-163.
- Blanco, J., Marino, C., Martín, H., Acosta, C.P. 2007. Anatomical distribution of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 50: 1011-1018.
- Blanco-Pérez, J. 2001. Episodios Nocivos por Fitoplancton. En Maeda-Martínez, A.N. (Ed.), *Los Moluscos Pectínidos De Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura*. Editorial Limusa, México, pp. 285-324.
- Bøe, R., Gjertsen, B.T., Vintermyr, O.K., Houge, G., Lanotte, M., Døskeland, S.O. 1991. The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. *Exp. Cell Res.*, 195: 237-246.
- Borges-Walmsley, M.I., McKeegan, K.S., Walmsley, A.R. 2003. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.*, 376: 313-338.
- Borges-Walmsley, M.I., Walmsley, A.R. 2001. The structure and function of drug pumps. *Trends Microbiol.*, 9: 71-79.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., Wijnholds, J. 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.*, 92: 1295-1302.
- Bosnjak, I., Uhlinger, K.R., Heim, W., Smital, T., Franekić-Colić, J., Coale, K., Epel, D., Hamdoun, A. 2009. Multidrug efflux transporters limit accumulation of inorganic, but not organic, mercury in sea urchin embryos. *Environ. Sci. Technol.*, 43: 8374-8380.

- Britvić, S., Kurelec, B. 1999. The effect of inhibitors of multixenobiotic resistance mechanism on the production of mutagens by *Dreissena polymorpha* in waters spiked with premutagens. *Aquat. Toxicol.*, 47: 107-116.
- Brusca, R.C., Brusca, G.J. 2005. Filo Moluscos (Mollusca), Capítulo 20, pp. 757-832. En *Invertebrados*. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España S.L., Madrid.
- Cai, S.Y., Soroka, C.J., Ballatori, N., Boyer, J.L. 2003. Molecular characterization of a multidrug resistance-associated protein, Mrp2, from the little skate. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 284: R125-130.
- Cai, X., Bikadi, Z., Ni, Z., Lee, E.W., Wang, H., Rosenberg, M.F., Mao, Q. 2010. Role of basic residues within or near the predicted transmembrane helix 2 of the human breast cancer resistance protein in drug transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 333: 670-681.
- Camacho, A.P., Cuña Casasbellas, M.A. 1992. Cultivo de Bivalvos en batea. Volumen 13: Unidades Didácticas De Acuicultura. Xunta de Galicia, Consellería de Pesca Marisqueo e Acuicultura, Galicia.
- Campbell, J.D., Koike, K., Moreau, C., Sansom, M.S., Deeley, R.G., Cole, S.P. 2004. Molecular modeling correctly predicts the functional importance of Phe⁵⁹⁴ in transmembrane helix 11 of the multidrug resistance protein, MRP1 (ABCC1). *J. Biol. Chem.*, 279: 463-468.
- Chambers, T.C., Raynor, R.L., Kuo, J.F. 1993. Multidrug-resistant human KB carcinoma cells are highly resistant to the protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A. Analysis of potential mechanisms involved in toxin resistance. *Int. J. Cancer*, 53: 323-327.
- Chapuy, B., Koch, R., Radunski, U., Corsham, S., Cheong, N., Inagaki, N., Ban, N., Wenzel, D., Reinhardt, D., Zapf, A., Schweyer, S., Kosari, F., Klapper, W., Truemper, L., Wulf, G.G. 2008. Intracellular ABC transporter A3 confers multidrug resistance in leukemia cells by lysosomal drug sequestration. *Leukemia*, 22: 1576-1586.
- Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M., Roninson, I.B. 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 47: 381-389.
- Chen, H., Rossier, C., Lalioti, M.D., Lynn, A., Chakravarti, A., Perrin, G., Antonarakis, S.E. 1996. Cloning of the cDNA for a human homologue of the *Drosophila white* gene and mapping to chromosome 21q22.3. *Am. J. Hum. Genet.*, 59: 66-75.

- Chen, J., Sharma, S., Quirocho, F.A., Davidson, A.L. 2001. Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98: 1525-1530.
- Chen, Z.S., Guo, Y., Belinsky, M.G., Kotova, E., Kruh, G.D. 2005. Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol. Pharmacol.*, 67: 545-557.
- Chen, Z.S., Hopper-Borge, E., Belinsky, M.G., Shchaveleva, I., Kotova, E., Kruh, G.D. 2003. Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol. Pharmacol.*, 63: 351-358.
- Childs, S., Yeh, R.L., Hui, D., Ling, V. 1998. Taxol resistance mediated by transfection of the liver-specific sister gene of P-glycoprotein. *Cancer Res.*, 58: 4160-4167.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, 162: 156-159.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Poletti, R. 2002. The detection and identification of 42, 43, 44, 45, 46, 47, 55-heptanor-41-oxoyessotoxin, a new marine toxin from adriatic shellfish, by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.*, 15: 979-984.
- Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M., Deeley, R.G. 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650-1654.
- Conseil, G., Deeley, R.G., Cole, S.P. 2006. Functional importance of three basic residues clustered at the cytosolic interface of transmembrane helix 15 in the multidrug and organic anion transporter MRP1 (ABCC1). *J. Biol. Chem.*, 281: 43-50.
- Conseil, G., Deeley, R.G., Cole, S.P. 2005. Role of two adjacent cytoplasmic tyrosine residues in MRP1 (ABCC1) transport activity and sensitivity to sulfonylureas. *Biochem. Pharmacol.*, 69: 451-461.
- Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S., Wiegand, C. 2008. Multi-xenobiotic-resistance a possible explanation for the insensitivity of bivalves towards cyanobacterial toxins. *Toxicon*, 52: 936-943.
- Cordes, F.S., Bright, J.N., Sansom, M.S. 2002. Proline-induced distortions of transmembrane helices. *J. Mol. Biol.*, 323: 951-960.
- Croop, J.M., Tiller, G.E., Fletcher, J.A., Lux, M.L., Raab, E., Goldenson, D., Son, D., Arciniegas, S., Wu, R.L. 1997. Isolation and characterization of a mammalian homolog of the *Drosophila white* gene. *Gene*, 185: 77-85.

- Daiguji, M., Satake, M., James, K.J., Bishops, A., MacKenzie, L., Naoki, H., Yasumoto, T. 1998. Structures of new pectenotoxin analogs, pectenotoxin-2 seco acid and 7-epi-pectenotoxin-2 seco acid, isolated from a dinoflagellate and greenshell mussels. *Chem. Lett.*, 29: 653-654.
- Dano, K. 1973. Active outward transport of daunomycin in resistant ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 323: 466-483.
- Dazert, P., Meissner, K., Vogelgesang, S., Heydrich, B., Eckel, L., Böhm, M., Warzok, R., Kerb, R., Brinkmann, U., Schaeffeler, E., Schwab, M., Cascorbi, I., Jedlitschky, G., Kroemer, H.K. 2003. Expression and localization of the multidrug resistance protein 5 (MRP5/ABCC5), a cellular export pump for cyclic nucleotides, in human heart. *Am. J. Pathol.*, 163: 1567-1577.
- de Cerio, O.D., Bilbao, E., Cajaraville, M.P., Cancio, I. 2012. Regulation of xenobiotic transporter genes in liver and brain of juvenile thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) after exposure to Prestige-like fuel oil and to perfluorooctane sulfonate. *Gene*, 498: 50-58.
- Dean, M., Hamon, Y., Chimini, G. 2001a. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.*, 42: 1007-1017.
- Dean, M., Rzhetsky, A., Allikmets, R. 2001b. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.*, 11: 1156-1166.
- Deeley, R.G., Westlake, C., Cole, S.P. 2006. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol. Rev.*, 86: 849-899.
- Della Torre, C., Zaja, R., Loncar, J., Smital, T., Focardi, S., Corsi, I. 2012. Interaction of ABC transport proteins with toxic metals at the level of gene and transport activity in the PLHC-1 fish cell line. *Chem. Biol. Interact.*, 198: 9-17.
- Dheilly, N.M., Lelong, C., Huvet, A., Favrel, P. 2011. Development of a Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) 31,918-feature microarray: identification of reference genes and tissue-enriched expression patterns. *BMC Genomics*, 12: 468.
- Diop, N.K., Hrycyna, C.A. 2005. N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry*, 44: 5420-5429.
- Doucette, G.J., Anderson, D.M. 1993. Intracellular distribution of saxitoxin in *Alexandrium fundyense*. En Smayda, T., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*. Editorial Elsevier, Amsterdam, pp. 863-868.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., Ross, D.D. 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 15665-15670.

- Draisici, R., Ferretti, E., Palleschi, L., Marchiafava, C., Poletti, R., Milandri, A., Ceredi, A., Pompei, M. 1999. High levels of yessotoxin in mussels and presence of yessotoxin and homoyessotoxin in dinoflagellates of the Adriatic Sea. *Toxicon*, 37: 1187-1193.
- Ejendal, K.F., Diop, N.K., Schweiger, L.C., Hrycyna, C.A. 2006. The nature of amino acid 482 of human ABCG2 affects substrate transport and ATP hydrolysis but not substrate binding. *Protein Sci.*, 15: 1597-1607.
- Escudeiro Rossignoli, A. 2012. Acumulación de toxinas DSP en el mejillón *Mytilus galloprovincialis*. Tesis Doctoral. USC.
- Eufemia, N., Clerte, S., Girshick, S., Epel, D. 2002. Algal products as naturally occurring substrates for p-glycoprotein in *Mytilus californianus*. *Mar. Biol.*, 140: 343-353.
- Eufemia, N.A., Epel, D. 2000. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquat. Toxicol.*, 49: 89-100.
- Farley, R.A., Schreiber, S., Wang, S.G., Scheiner-Bobis, G. 2001. A hybrid between Na^+, K^+ -ATPase and H^+, K^+ -ATPase is sensitive to palytoxin, ouabain, and SCH 28080. *J. Biol. Chem.*, 276: 2608-2615.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Fernández Cañamero, M.L. 2008. Estudio de las toxinas DSP producidas por los dinoflagelados de las Rías Gallegas y de sus transformaciones en los moluscos: gestión y mitigación de los episodios tóxicos. Tesis Doctoral. USC.
- Fernández, M.L., Míguez, A., Morono, A., Cacho, E., Martínez, A., Blanco, J. 1998. Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. En Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Editorial Xunta de Galicia e Intergovernmental Oceanographic Commision (UNESCO), Galicia, pp. 449-452.
- Fernández, J.J., Cadenas, M.L., Souto, M.L., Trujillo, M.M., Norte, M. 2002. Okadaic acid, useful tool for studying cellular processes. *Curr. Med. Chem.*, 9: 229-262.
- Fessard, V., Grosse, Y., Pfohl-Leszkowicz, A., Puiseux-Dao, S. 1996. Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes. *Mutat. Res.*, 361: 133-141.
- Fiorentini, C., Matarrese, P., Fattorossi, A., Donelli, G. 1996. Okadaic acid induces changes in the organization of F-actin in intestinal cells. *Toxicon*, 34: 937-945.
- Fischer, S., Loncar, J., Zaja, R., Schnell, S., Schirmer, K., Smital, T., Luckenbach, T. 2011. Constitutive mRNA expression and protein activity levels of nine ABC

- efflux transporters in seven permanent cell lines derived from different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 101: 438-446.
- Fischer, S., Pietsch, M., Schirmer, K., Luckenbach, T. 2010. Identification of multi-drug resistance associated proteins MRP1 (ABCC1) and MRP3 (ABCC3) from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mar. Environ. Res.*, 69: 7-10.
- Flens, M.J., Zaman, G.J., van der Valk, P., Izquierdo, M.A., Schroeijers, A.B., Scheffer, G.L., van der Groep, P., de Haas, M., Meijer, C.J., Scheper, R.J. 1996. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am. J. Pathol.*, 148: 1237-1247.
- Food and Agriculture Organization, FAO. 2007. Marine Biotoxins. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- Food and Agriculture Organization, FAO. 2004. Joint FAO/IOC/WHO ad hoc expert consultation on biotoxins in Bivalve Mollusk, Oslo.
- Frank, N.Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A.M., Gasser, M., Sayegh, M.H., Sadee, W., Frank, M.H. 2005. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.*, 65: 4320-4333.
- Franzellitti, S., Capuzzo, A., Viarengo, A., Fabbri, E. 2011. Interactive effects of nickel and chlorpyrifos on Mediterranean mussel cAMP-mediated cell signaling and MXR-related gene expressions. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 154: 377-382.
- Franzellitti, S., Fabbri, E. 2006. Cytoprotective responses in the Mediterranean mussel exposed to Hg^{2+} and CH_3Hg^+ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 351: 719-725.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Suguri, H., Yoshizawa, S., Takagi, K., Uda, N., Wakamatsu, K., Yamada, K., Murata, M., Yasumoto, T. 1988. Diarrhetic shellfish toxin, dinophysistoxin-1, is a potent tumor promoter on mouse skin. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79: 1089-1093.
- Gao, M., Cui, H.R., Loe, D.W., Grant, C.E., Almquist, K.C., Cole, S.P., Deeley, R.G. 2000. Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *J. Biol. Chem.*, 275: 13098-13108.
- Gao, M., Yamazaki, M., Loe, D.W., Westlake, C.J., Grant, C.E., Cole, S.P., Deeley, R.G. 1998. Multidrug resistance protein. Identification of regions required for active transport of leukotriene C4. *J. Biol. Chem.*, 273: 10733-10740.
- Gökirmak, T., Campanale, J.P., Shipp, L.E., Moy, G.W., Tao, H., Hamdoun, A. 2012. Localization and substrate selectivity of sea urchin Multidrug (MDR) Efflux Transporters. *J. Biol. Chem.*, 287: 43876-43883.
- Goldstone, J.V., Hamdoun, A., Cole, B.J., Howard-Ashby, M., Nebert, D.W., Scally, M., Dean, M., Epel, D., Hahn, M.E., Stegeman, J.J. 2006. The chemical

- defensome: environmental sensing and response genes in the *Strongylocentrotus purpuratus* genome. *Dev. Biol.*, 300: 366-384.
- Gosling, E. 2003. Bivalve Molluscs. Biology, ecology and culture. Editorial Wiley-Blackwell, U.K.
- Gottesman, M.M., Ambudkar, S.V. 2001. Overview: ABC transporters and human disease. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 33: 453-458.
- Gottesman, M.M., Fojo, T., Bates, S.E. 2002. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer.*, 2: 48-58.
- Graf, G.A., Yu, L., Li, W.P., Gerard, R., Tuma, P.L., Cohen, J.C., Hobbs, H.H. 2003. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J. Biol. Chem.*, 278: 48275-48282.
- Grant, C.E., Kurz, E.U., Cole, S.P., Deeley, R.G. 1997. Analysis of the intron-exon organization of the human multidrug-resistance protein gene (MRP) and alternative splicing of its mRNA. *Genomics*, 45: 368-378.
- Gutmann, H., Hruz, P., Zimmermann, C., Beglinger, C., Drewe, J. 2005. Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract. *Biochem. Pharmacol.*, 70: 695-699.
- Haimeur, A., Deeley, R.G., Cole, S.P. 2002. Charged amino acids in the sixth transmembrane helix of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) are critical determinants of transport activity. *J. Biol. Chem.*, 277: 41326-41333.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hallegraeff, G.M. 1995. Harmful algal blooms: a global overview. Manual on Harmful Marine Microalgae. IOC Manuals and Guides 33: 1-22.
- Hamdoun, A.M., Cherr, G.N., Roepke, T.A., Epel, D. 2004. Activation of multidrug efflux transporter activity at fertilization in sea urchin embryos (*Strongylocentrotus purpuratus*). *Dev. Biol.*, 276: 452-462.
- Hamdoun, A.M., Griffin, F.J., Cherr, G.N. 2002. Tolerance to biodegraded crude oil in marine invertebrate embryos and larvae is associated with expression of a multixenobiotic resistance transporter. *Aquat. Toxicol.*, 61: 127-140.
- Harris, M.J., Kuwano, M., Webb, M., Board, P.G. 2001. Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/MOAT). *J. Biol. Chem.*, 276: 20876-20881.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.*, 8: R19.

- Henrich, C.J., Robey, R.W., Takada, K., Bokesch, H.R., Bates, S.E., Shukla, S., Ambudkar, S.V., McMahon, J.B., Gustafson, K.R. 2009. Botryllamides: natural product inhibitors of ABCG2. *ACS Chem. Biol.*, 4: 637-647.
- Henriksen, U., Fog, J.U., Litman, T., Gether, U. 2005. Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2. *J. Biol. Chem.*, 280: 36926-36934.
- Henry, M., Boucaud-Camou, E., Lefort, Y. 1991. Functional microanatomy of the digestive gland of the scallop *Pecten maximus* (L.). *Aquat. Living Res.*, 4: 191-202.
- Hess, P., McMahon, T., Slattery, D., Swords, D., Dowling, G., McCarron, M., Clarke, D., Gibbons, W., Silke, W., O' Cinneide, M. 2003. Use of LC-MS testing to identify lipophilic toxins, to establish local trends and interspecies differences and to test the comparability of LC-MS testing with mouse bioassay: an example from the Irish Biotxin Monitoring Programme 2001. En Villalba, A., Reguera, B., Romalde, J.L., Beiras, R. (Eds.), *Molluscan Shellfish Safety. Proceedings of the Fourth International Conference on Molluscan Shellfish Safety*. Santiago de Compostela. Editorial Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia e IOC of UNESCO, España, pp. 57-66.
- Higgins, C.F. 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, 446: 749-757.
- Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 8: 67-113.
- Higgins, C.F. Linton, K.J., 2004. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 11: 918-926.
- Hill, R.B., Welsh, J.H. 1966. Heart, circulation, and blood cells. En Wilbur, K.M., Younge, C.M. (Eds.), *Physiology of Mollusca*. Editorial Academic Press, New York, pp. 126-174.
- Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Leslie, E.M., Gerlach, J.H., Grant, C.E., Deeley, R.G., Cole, S.P. 1997. Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH₂ terminus. *J. Biol. Chem.*, 272: 23623-23630.
- Hirohashi, T., Suzuki, H., Takikawa, H., Sugiyama, Y. 2000. ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *J. Biol. Chem.*, 275: 2905-2910.
- Hirouchi, M., Suzuki, H., Itoda, M., Ozawa, S., Sawada, J., Ieiri, I., Ohtsubo, K., Sugiyama, Y. 2004. Characterization of the cellular localization, expression level, and function of SNP variants of MRP2/ABCC2. *Pharm. Res.*, 21: 742-748.

- Hofacker, M., Gompf, S., Zutz, A., Presenti, C., Haase, W., van der Does, C., Model, K., Tampé, R. 2007. Structural and functional fingerprint of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 282: 3951-3961.
- Hollenstein, K., Dawson, R.J., Locher, K.P. 2007. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 17: 412-418.
- Honjo, Y., Hrycyna, C.A., Yan, Q.W., Medina-Pérez, W.Y., Robey, R.W., van de Laar, A., Litman, T., Dean, M., Bates, S.E. 2001. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.*, 61: 6635-6639.
- Hopper, E., Belinsky, M.G., Zeng, H., Tosolini, A., Testa, J.R., Kruh, G.D. 2001. Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily. *Cancer Lett.*, 162: 181-191.
- Hopper-Borge, E., Chen, Z.S., Shchaveleva, I., Belinsky, M.G., Kruh, G.D. 2004. Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res.*, 64: 4927-4930.
- Hu, T., Curtis, J.M., Walter, J.A., McLachlan, J.L., Wright, J.L.C. 1995. Two new water-soluble DSP toxin derivatives from the dinoflagellate *Prorocentrum maculosum*: possible storage and excretion products. *Tetrahedron Lett.*, 36: 9273-9276.
- Huang, X. 1992. A contig assembly program based on sensitive detection of fragment overlaps. *Genomics*, 14: 18-25.
- Hughes, A.L. 1994. Evolution of the ATP-binding-cassette transmembrane transporters of vertebrates. *Mol. Biol. Evol.*, 11: 899-910.
- Huisman, M.T., Chhatta, A.A., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Schinkel, A.H. 2005. MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid. *Int. J. Cancer*, 116: 824-829.
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F., Kim, S.H. 1998. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, 396: 703-707.
- Hyde, S.C., Emsley, P., Hartshorn, M.J., Mimmack, M.M., Gileadi, U., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., Gill, D.R., Hubbard, R.E., Higgins, C.F. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, 346: 362-365.
- Iglesias, J.I.P., Navarro, E., Álvarez, J.P., Armentia, I. 1993. Feeding, particle selection and absorption on cockles *Cerastoderma edule* (L.) exposed to variable conditions of food concentrations and quality. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 162: 177-198.

- Ismair, M.G., Häusler, S., Stuermer, C.A., Guyot, C., Meier, P.J., Roth, J., Stieger, B. 2009. ABC-transporters are localized in caveolin-1-positive and reggie-1-negative and reggie-2-negative microdomains of the canalicular membrane in rat hepatocytes. *Hepatology*, 49: 1673-1682.
- Ito, K., Oleschuk, C.J., Westlake, C., Vasa, M.Z., Deeley, R.G., Cole, S.P. 2001a. Mutation of Trp¹²⁵⁴ in the multispecific organic anion transporter, multidrug resistance protein 2 (MRP2) (ABCC2), alters substrate specificity and results in loss of methotrexate transport activity. *J. Biol. Chem.*, 276: 38108-38114.
- Ito, K., Olsen, S.L., Qiu, W., Deeley, R.G., Cole, S.P. 2001b. Mutation of a single conserved tryptophan in multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) results in loss of drug resistance and selective loss of organic anion transport. *J. Biol. Chem.*, 276: 15616-15624.
- Ito, K., Suzuki, H., Sugiyama, Y. 2001c. Charged amino acids in the transmembrane domains are involved in the determination of the substrate specificity of rat Mrp2. *Mol. Pharmacol.*, 59: 1077-1085.
- Ivanina, A.V., Sokolova, I.M. 2008. Effects of cadmium exposure on expression and activity of P-glycoprotein in eastern oysters, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Aquat. Toxicol.*, 88: 19-28.
- James, K.J., Moroney, C., Roden, C., Satake, M., Yasumoto, T., Lehane, M., Furey, A. 2003. Ubiquitous 'benign' alga emerges as the cause of shellfish contamination responsible for the human toxic syndrome, azaspiracid poisoning. *Toxicon*, 41: 145-151.
- Janvilisri, T., Venter, H., Shahi, S., Reuter, G., Balakrishnan, L., van Veen, H.W. 2003. Sterol transport by the human breast cancer resistance protein (ABCG2) expressed in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.*, 278: 20645-20651.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.*, 8: 275-282.
- Jones, P.M., George, A.M. 2004. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol. Life Sci.*, 61: 682-699.
- Jørgensen, C.B. 1989. Water processing in ciliary feeders, with special reference to the bivalve filter pump. *Comp. Biochem. Physiol. A: Physiol.*, 94: 383-394.
- Juliano, R.L., Ling, V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, 455: 152-162.
- Kage, K., Fujita, T., Sugimoto, Y. 2005. Role of Cys-603 in dimer/oligomer formation of the breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2. *Cancer. Sci.*, 96: 866-872.
- Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Sugimoto, Y. 2002. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as

- drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int. J. Cancer*, 97: 626-630.
- Käll, L., Krogh, A., Sonnhammer, E.L. 2005. An HMM posterior decoder for sequence feature prediction that includes homology information. *Bioinformatics*, 21: 251-257.
- Kartner, N., Riordan, J.R., Ling, V. 1983. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 221, 1285-1288.
- Keppler, C., Ringwood, A.H. 2001. Expression of P-glycoprotein in the gills of oysters, *Crassostrea virginica*: seasonal and pollutant related effects. *Aquat. Toxicol.*, 54: 195-204.
- Keppler, D., Leier, I., Jedlitschky, G. 1997. Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Biol. Chem.*, 378: 787-791.
- Kingtong, S., Chitramvong, Y., Janvilisri, T. 2007. ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. *Aquat. Toxicol.*, 85: 124-132.
- Kiuchi, Y., Suzuki, H., Hirohashi, T., Tyson, C.A., Sugiyama, Y. 1998. cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3). *FEBS Lett.*, 433: 149-152.
- Klett, E.L., Lee, M.H., Adams, D.B., Chavin, K.D., Patel, S.B. 2004. Localization of ABCG5 and ABCG8 proteins in human liver, gall bladder and intestine. *BMC Gastroenterol.*, 4: 21.
- Kobayashi, A., Takanezawa, Y., Hirata, T., Shimizu, Y., Misasa, K., Kioka, N., Arai, H., Ueda, K., Matsuo, M. 2006. Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J. Lipid Res.*, 47: 1791-1802.
- Kobayashi, H., Parton, A., Czechanski, A., Durkin, C., Kong, C.C., Barnes, D. 2007. Multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3/Abcc3/Moat-D) is expressed in the SAE *Squalus acanthias* shark embryo-derived cell line. *Zebrafish*, 4: 261-275.
- Köhler, A., Lauritzen, B., Jansen, D., Böttcher, P., Tegoliwa, L., Krüner, G., Broeg, K. 1998. Detection of P-glycoprotein mediated MDR/MXR in *Carcinus maenas* hepatopancreas by immuno-gold-silver labeling. *Mar. Environ. Res.*, 46: 411-414.
- Koike, K., Conseil, G., Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P. 2004. Identification of proline residues in the core cytoplasmic and transmembrane regions of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) important for transport function, substrate specificity, and nucleotide interactions. *J. Biol. Chem.*, 279: 12325-12336.

- Koike, K., Oleschuk, C.J., Haimeur, A., Olsen, S.L., Deeley, R.G., Cole, S.P. 2002. Multiple membrane-associated tryptophan residues contribute to the transport activity and substrate specificity of the human multidrug resistance protein, MRP1. *J. Biol. Chem.*, 277: 49495-49503.
- Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., van Eijk, M.J., Juijn, J.A., Baas, F., Borst, P. 1997. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.*, 57: 3537-3547.
- Kozak, M. 2004. How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mRNAs? *Gene*, 343: 41-54.
- Kozak, M. 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234: 187-208.
- Kozak, M. 1992. A consideration of alternative models for the initiation of translation in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 27: 385-402.
- Kozak, M. 1989. The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.*, 108: 229-241.
- Kozak, M. 1987. Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. *Mol. Cell. Biol.*, 7: 3438-3445.
- Kozak, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44: 283-292.
- Kruh, G.D., Belinsky, M.G. 2003. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene*, 22: 7537-7552.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.*, 27: 95-125.
- Kurelec, B., Lucić, D., Pivčević, B., Krča, S. 1995. Induction and reversion of multixenobiotic resistance in the marine snail *Monodonta turbinata*. *Mar. Biol.*, 123: 305-312.
- Kurelec, B. 1995a. Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: Ecotoxic consequences. *Sci. Total Environ.*, 171: 197-204.
- Kurelec, B. 1995b. Reversion of the multixenobiotic resistance mechanism in gills of a marine mussel *Mytilus galloprovincialis* by a model inhibitor and environmental modulators of P170-glycoprotein. *Aquat. Toxicol.* 33, 93-103.
- Kurelec, B. 1992. The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22: 23-43.

- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., López, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23: 2947-2948.
- Lassus, P., Proniewski, F., Pigeon, C., Veret, L., Le Déan, L., Maggi, P., Bardouil, M., Truquet, P. 1990. The diurnal vertical migrations of *Dinophysis* in an outdoor tank at Antifer (Normandy, France). *Aquat. Living Res.*, 3: 143-145.
- Lee, J., Igarashi, T., Fraga, S., Dahl, E., Hovgaard, P., Yasumoto, T. 1989. Determination of diarrhetic shellfish toxins in various dinoflagellate species. *J. Appl. Phycol.*, 1: 147-152.
- Lee, K., Belinsky, M.G., Bell, D.W., Testa, J.R., Kruh, G.D. 1998. Isolation of MOAT-B, a widely expressed multidrug resistance-associated protein/canicular multispecific organic anion transporter-related transporter. *Cancer Res.*, 58: 2741-2747.
- Leggas, M., Adachi, M., Scheffer, G.L., Sun, D., Wielinga, P., Du, G., Mercer, K.E., Zhuang, Y., Panetta, J.C., Johnston, B., Scheper, R.J., Stewart, C.F., Schuetz, J.D. 2004. Mrp4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 7612-7621.
- Lehane, L., Lewis, R.J. 2000. Ciguatera: recent advances but the risk remains. *Int. J. Food Microbiol.*, 61: 91-125.
- Leong, J.S., Jantzen, S.G., von Schalburg, K.R., Cooper, G.A., Messmer, A.M., Liao, N.Y., Munro, S., Moore, R., Holt, R.A., Jones, S.J., Davidson, W.S., Koop, B.F. 2010. *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. *BMC Genomics*, 11: 279.
- Lerga, A., Richard, C., Delgado, M.D., Canelles, M., Frade, P., Cuadrado, M.A., León, J. 1999. Apoptosis and mitotic arrest are two independent effects of the protein phosphatases inhibitor okadaic acid in K562 leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 260: 256-264.
- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P. 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 204: 216-237.
- Leslie, E.M., Haimeur, A., Waalkes, M.P. 2004. Arsenic transport by the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J. Biol. Chem.*, 279: 32700-32708.
- Leslie, E.M., Létourneau, I.J., Deeley, R.G., Cole, S.P. 2003. Functional and structural consequences of cysteine substitutions in the NH₂ proximal region of the human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Biochemistry*, 42: 5214-5224.

- Ling, D., Salvaterra, P.M., 2011. Robust RT-qPCR data normalization: validation and selection of internal reference genes during post-experimental data analysis. *PLoS One*, 6: e17762.
- Linton, K.J., 2007. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)*, 22: 122-130.
- Linton, K.J., Higgins, C.F. 2007. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch.*, 453: 555-567.
- Liska, D.J. 1998. The detoxification enzyme systems. *Altern. Med. Rev.*, 3: 187-198.
- Liu, Y., Yang, Y., Qi, J., Peng, H., Zhang, J.T. 2008. Effect of cysteine mutagenesis on the function and disulfide bond formation of human ABCG2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 326: 33-40.
- Loncar, J., Popović, M., Zaja, R., Smital, T. 2010. Gene expression analysis of the ABC efflux transporters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 151: 209-215.
- Long, Y., Li, Q., Cui, Z. 2011a. Molecular analysis and heavy metal detoxification of ABCC1/MRP1 in zebrafish. *Mol. Biol. Rep.*, 38: 1703-1711.
- Long, Y., Li, Q., Li, J., Cui, Z. 2011b. Molecular analysis, developmental function and heavy metal-induced expression of ABCC5 in zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 158: 46-55.
- Long, Y., Li, Q., Wang, Y., Cui, Z. 2011c. MRP proteins as potential mediators of heavy metal resistance in zebrafish cells. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 153: 310-317.
- Long, Y., Li, Q., Zhong, S., Wang, Y., Cui, Z. 2011d. Molecular characterization and functions of zebrafish ABCC2 in cellular efflux of heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 153: 381-391.
- Loo, T.W., Bartlett, M.C., Clarke, D.M. 2002. The "LSGGQ" motif in each nucleotide-binding domain of human P-glycoprotein is adjacent to the opposing walker A sequence. *J. Biol. Chem.*, 277: 41303-41306.
- Lorkowski, S., Cullen, P. 2002. ABCG subfamily of human ATP-binding cassette proteins. *Pure Appl. Chem.*, 74: 2057-2081.
- Luckenbach, T., Epel, D. 2008. ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 294: R1919-1929.
- Lüdeking, A., Köhler, A. 2002. Identification of six mRNA sequences of genes related to multixenobiotic resistance (MXR) and biotransformation in *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 238: 115-124.

- Luedeking, A., Koehler, A. 2004. Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.*, 69: 1-10.
- Luedeking, A., Cornelis J.F. Van Noorden, C.J.F., Koehler, A. 2005. Identification and characterisation of a multidrug resistance-related protein mRNA in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 286: 167-175.
- Mahmood, N.A., Carmichael, W.W. 1986. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flosaquae*. *Toxicon*, 24: 175-186.
- Makman, M., Stefano, G.B. 1984. Marine mussels and cephalopods as models for study of neuronal aging. En Mitchell, D.H., Johnson, T.E. (Eds.), *Invertebrate Models in Aging Research*. Editorial CRC Press, Florida, pp. 165-190.
- Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C., Schinkel, A.H., van De Vijver, M.J., Scheper, R.J., Schellens, J.H. 2001. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.*, 61: 3458-3464.
- Manfrin, C., Dreos, R., Battistella, S., Beran, A., Gerdol, M., Varotto, L., Lanfranchi, G., Venier, P., Pallavicini, A. 2010. Mediterranean mussel gene expression profile induced by okadaic acid exposure. *Environ. Sci. Technol.*, 44: 8276-8283.
- Mao, Q., Conseil, G., Gupta, A., Cole, S.P., Unadkat, J.D. 2004. Functional expression of the human breast cancer resistance protein in *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320: 730-737.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., Fong, J.H., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Omelchenko, M.V., Robertson, C.L., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zhang, N., Zheng, C., Bryant, S.H. 2011. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.*, 39: D225-229.
- Mauriz, O., Maneiro, V., Pérez-Parallé, M.L., Sánchez, J.L., Pazos, A.J. 2012. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies on the gonad of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. *Aquaculture*, 370-371: 158-165.
- McDevitt, C.A., Collins, R.F., Conway, M., Modok, S., Storm, J., Kerr, I.D., Ford, R.C., Callaghan, R. 2006. Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure*, 14: 1623-1632.
- McFadzen, I., Eufemia, N., Heath, C., Epel, D., Moore, M., Lowe, D. 2000. Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.*, 50: 319-323.

- Minier, C., Moore, M., Galgani, F., Claisse, D. 2006. Multixenobiotic resistance protein expression in *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and *Crassostrea gigas* from the French coasts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 322: 143-154.
- Minier, C., Akcha, F., Galgani, F. 1993. P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 106: 1029-1036.
- Minier, C., Borghi, V.V., Moore, M.N., Porte, C. 2000. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, 50: 167-176.
- Miwa, M., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Asada, S., Imai, Y., Sugimoto, Y. 2003. Single amino acid substitutions in the transmembrane domains of breast cancer resistance protein (BCRP) alter cross resistance patterns in transfectants. *Int. J. Cancer*, 107: 757-763.
- Miyake, K., Mickley, L., Litman, T., Zhan, Z., Robey, R., Cristensen, B., Brangi, M., Greenberger, L., Dean, M., Fojo, T., Bates, S.E. 1999. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.*, 59: 8-13.
- Mo, W., Qi, J., Zhang, J.T. 2012. Different roles of TM5, TM6, and ECL3 in the oligomerization and function of human ABCG2. *Biochemistry*, 51: 3634-3641.
- Mohrmann, K., van Eijndhoven, M.A., Schinkel, A.H., Schellens, J.H. 2005. Absence of N-linked glycosylation does not affect plasma membrane localization of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 56: 344-350.
- Mons, M.N., van Egmond, H.P., Speijers, G.J.A. 1998. Paralytic Shellfish Poisoning: A Review. Editorial Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Nederland.
- Moody, J.E., Millen, L., Binns, D., Hunt, J.F., Thomas, P.J. 2002. Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J. Biol. Chem.*, 277: 21111-21114.
- Morga, B., Arzul, I., Faury, N., Renault, T. 2010. Identification of genes from flat oyster *Ostrea edulis* as suitable housekeeping genes for quantitative real time PCR. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 937-945.
- Mori, Y., Nogami, K., Hayashi, H., Noyori, R. 2003. Sulfonyl-stabilized oxiranyllithium-based approach to polycyclic ethers. Convergent synthesis of the ABCDEF-ring system of yessotoxin and adriatoxin. *J. Org. Chem.*, 68: 9050-9060.
- Moroño, A., Fernández, M.L., Franco, J.M., Martínez, A., Reyero, I., Míguez, A., Cacho, E., Blanco, J. 1998a. PSP and DSP detoxification kinetics in mussel, *Mytilus galloprovincialis*: Effect of environmental parameters and body weight.

- En Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia e Intergovernmental Oceanographic Commision (UNESCO), Galicia, pp. 445-448.
- Moroño, A., Maneiro, J., Pazos, Y., Blanco, J. 1998b. Modelling the accumulation of PSP toxins in Galicia mussels: Results and perspectives. En Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commision (UNESCO), Galicia, pp. 441-444.
- Moroño, A., Arévalo, F., Fernández, M.L., Maneiro, J., Pazos, Y., Salgado, C., Blanco, J. 2003. Accumulation and transformation of DSP toxins in mussels *Mytilus galloprovincialis* during a toxic episode caused by *Dinophysis acuminata*. *Aquat. Toxicol.*, 62: 269-280.
- Morton, B. 1992. The evolution and success of the heteromyarian form in the *Mytiloida*. En Gosling, E. (Ed.), *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Editorial Elsevier, Amsterdam, pp. 21-52.
- Morton, B. 1983. Feeding and digestion in Bivalvia. En Saleuddin, A.S.M., Wilbur, K.M. (Eds.), *The Mollusca*. Editorial Academic Press, New York, pp. 65-147.
- Morton, S.L. 1998. Morphology and toxicology of *Prorocentrum faustiae* sp. nov., a toxic Species of non-planktonic dinoflagellate from Heron Island, Australia. *Bot. Mar.*, 41: 565-569.
- Mouratidou, T., Kaniou-Grigoriadou, I., Samara, C., Kouimtzis, T. 2006. Detection of the marine toxin okadaic acid in mussels during a diarrhetic shellfish poisoning (DSP) episode in Thermaikos Gulf, Greece, using biological, chemical and immunological methods. *Sci. Total Environ.*, 366: 894-904.
- Muramatsu, I., Uemura, D., Fujiwara, M., Narahashi, T. 1984. Characteristics of palytoxin-induced depolarization in squid axons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 231: 488-494.
- Murata, M., Shimitami, M., Sugitani, H., Oshima, Y., Yasumoto, T. 1982. Isolation and structural elucidation of the causative toxin of the diarrhetic shellfish poisoning. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 48: 549-552.
- Murata, M., Kumagai, M., Lee, J.S., Yasumoto, T. 1987. Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrhetic shellfish poisoning. *Tetrahedron Lett.*, 28: 5869-5872.
- Nakanishi, T., Doyle, L.A., Hassel, B., Wei, Y., Bauer, K.S., Wu, S., Pumplin, D.W., Fang, H.B., Ross, D.D. 2003. Functional characterization of human breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) expressed in the oocytes of *Xenopus laevis*. *Mol. Pharmacol.*, 64: 1452-1462.

- Narain, A.S. 1976. A review of the structure of the heart of Molluscs, particularly Bivalves, in relation to cardiac function. *J. Molluscan Stud.*, 42: 46-62.
- Navarro, A., Weisbach, S., Faria, M., Barata, C., Pina, B., Luckenbach, T. 2012. Abcb and Abcc transporter homologs are expressed and active in larvae and adults of zebra mussel and induced by chemical stress. *Aquat. Toxicol.*, 122-123: 144-152.
- Ni, Z., Bikadi, Z., Cai, X., Rosenberg, M.F., Mao, Q. 2010a. Transmembrane helices 1 and 6 of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): identification of polar residues important for drug transport. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 299: C1100-9.
- Ni, Z., Bikadi, Z., Rosenberg, M.F., Mao, Q. 2010b. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr. Drug Metab.*, 11: 603-617.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B., Deerfield, D.W. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW.NEWS*, 4: 14.
- Nikaido, K., Ames, G.F. 1999. One intact ATP-binding subunit is sufficient to support ATP hydrolysis and translocation in an ABC transporter, the histidine permease. *J. Biol. Chem.*, 274: 26727-26735.
- Nogueira, I.C., Saker, M.L., Pflugmacher, S., Wiegand, C., Vasconcelos, V.M. 2004. Toxicity of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol.*, 19: 453-459.
- Oesch, F., Arand, M. 1999. Xenobiotic Metabolism. En Marquardt, H., Schäfer, S.G., McClellan, R.O., Welsch, F. (Eds.), *Toxicology*. Editorial Academic Press, USA, pp. 83-109.
- Ogino, H., Kumagai, M., Yasumoto, T. 1997. Toxicologic evaluation of yessotoxin. *Nat. Toxins*, 5: 255-259.
- Oldfield, S., Lowry, C., Ruddick, J., Lightman, S. 2002. ABCG4: a novel human white family ABC-transporter expressed in the brain and eye. *Biochim. Biophys. Acta*, 1591: 175-179.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. 2012. El estado mundial de la Pesca y la Acuicultura, Roma.
- Ozvegy, C., Váradi, A., Sarkadi, B. 2002. Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J. Biol. Chem.*, 277: 47980-47990.
- Pain, S., Devin, S., Parant, M. 2007. Biomarker versus environmental factors: seasonal variations and modelling multixenobiotic defence (MXD) transport activity in transplanted zebra mussels. *Sci. Total Environ.*, 373: 103-112.

- Pain, S., Parant, M. 2007. Identification of multixenobiotic defence mechanism (MXR) background activities in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* as reference values for its use as biomarker in contaminated ecosystems. *Chemosphere*, 67: 1258-1263.
- Pain, S., Parant, M. 2003a. Multixenobiotic defense mechanism (MDMX) in bivalves. *C. R. Biol.*, 326: 659-672.
- Pain, S., Parant, M. 2003b. Response of multixenobiotic defence mechanism in *Dreissena polymorpha* exposed to environmental stress. *Chemosphere*, 52: 1105-1113.
- Paulusma, C.C., Bosma, P.J., Zaman, G.J., Bakker, C.T., Otter, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Borst, P., Oude Elferink, R.P. 1996. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science*, 271: 1126-1128.
- Payen, L., Gao, M., Westlake, C., Theis, A., Cole, S.P., Deeley, R.G. 2005. Functional interactions between nucleotide binding domains and leukotriene C4 binding sites of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *Mol. Pharmacol.*, 67: 1944-1953.
- Payen, L.F., Gao, M., Westlake, C.J., Cole, S.P., Deeley, R.G. 2003. Role of carboxylate residues adjacent to the conserved core Walker B motifs in the catalytic cycle of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *J. Biol. Chem.*, 278: 38537-38547.
- Peng, Y.G., Taylor, T.B., Finch, R.E., Switzer, R.C., Ramsdell, J.S. 1994. Neuroexcitatory and neurotoxic actions of the amnesic shellfish poison, domoic acid. *Neuroreport*, 5: 981-985.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.*, 26: 509-515.
- Pflugmacher, S., Wiegand, C., Oberemm, A., Beattie, K.A., Krause, E., Codd, G.A., Steinberg, C.E. 1998. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. *Biochim. Biophys. Acta*, 1425: 527-533.
- Pietsch, C., Wiegand, C., Ame, M.V., Nicklisch, A., Wunderlin, D., Pflugmacher, S. 2001. The effects of a cyanobacterial crude extract on different aquatic organisms: evidence for cyanobacterial toxin modulating factors. *Environ. Toxicol.*, 16: 535-542.
- Pillet, S., Pereira, A., Braekman, J.C., Houvenaghel, G. 1995. Patterns in long term accumulation of okadaic acid and DTX-1 in blue mussels, *Mytilus edulis*, experimentally fed with the DSP containing alga *Prorocentrum lima*. En Lassus,

- P., Arzul, G., Erard, E., Gentien, P., Marcaillou, C. (Eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Editorial Lavoisier, Intercept Ltd., Paris, pp. 487-492.
- Pirie, B.J.S., George, S.G. 1979. Ultrastructure of the heart and excretory system of *Mytilus edulis* (L.). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 59: 819-829.
- Polgar, O., Ediriwickrema, L.S., Robey, R.W., Sharma, A., Hegde, R.S., Li, Y., Xia, D., Ward, Y., Dean, M., Ozvegy-Laczka, C., Sarkadi, B., Bates, S.E. 2009. Arginine 383 is a crucial residue in ABCG2 biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1788: 1434-1443.
- Polgar, O., Ozvegy-Laczka, C., Robey, R.W., Morisaki, K., Okada, M., Tamaki, A., Koblos, G., Elkind, N.B., Ward, Y., Dean, M., Sarkadi, B., Bates, S.E. 2006. Mutational studies of G553 in TM5 of ABCG2: a residue potentially involved in dimerization. *Biochemistry*, 45: 5251-5260.
- Polgar, O., Robey, R.W., Morisaki, K., Dean, M., Michejda, C., Sauna, Z.E., Ambudkar, S.V., Tarasova, N., Bates, S.E. 2004. Mutational analysis of ABCG2: role of the GXXXG motif. *Biochemistry*, 43: 9448-9456.
- Pozza, A., Pérez-Victoria, J.M., Sardo, A., Ahmed-Belkacem, A., Di Pietro, A. 2006. Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482. *Cell Mol. Life Sci.*, 63: 1912-1922.
- Puerto, M., Campos, A., Prieto, A., Cameán, A., de Almeida, A.M., Coelho, A.V., Vasconcelos, V. 2011. Differential protein expression in two bivalve species; *Mytilus galloprovincialis* and *Corbicula fluminea*; exposed to *Cylindrospermopsis raciborskii* cells. *Aquat. Toxicol.*, 101: 109-116.
- Purchon, R.D. 1987. The stomach in the Bivalvia. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., Ser. B.*, 316: 183-276.
- Quesada, A.R., García Grávalos, M.D., Fernández Puentes, J.L. 1996. Polyaromatic alkaloids from marine invertebrates as cytotoxic compounds and inhibitors of multidrug resistance caused by P-glycoprotein. *Br. J. Cancer*, 74: 677-682.
- Quilliam, M.A. 2003. Chemical methods for lipophilic shellfish toxins. En Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on Oceanographic Methodology*. Editorial Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO), Paris, pp. 211-245.
- Quilliam, M.A. 2001. Committee on natural toxins and food allergens. phycotoxins. general referee reports. *J. AOAC. Int.*, 84: 194-201.
- Quilliam, M.A., Hardstaff, W.R., Ishida, N., McLachlan, J.L., Reeves, A.R., Ross, N.W., Windust, A.J. 1996. Production of diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins by *Prorocentrum lima* in culture and development of analytical methods. En Yasumoto, T., Oshima, Y., Fukuyo, Y. (Eds.), *Harmful and Toxic Algal*

- Blooms*. Editorial Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO), Paris, pp. 289-292.
- Regueiro, J., Rossignoli, A.E., Álvarez, G., Blanco, J. 2011. Automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determination of lipophilic marine toxins in shellfish. *Food Chem.*, 129: 533-540.
- Reguera, B., Bravo, I., Marcaillou-Le Baut, C., Masselin, P., Fernández, M.L., Míguez, A., Martínez, A. 1993. Monitoring of *Dinophysis* spp and vertical distribution of okadaic acid on mussel rafts from Ría de Pontevedra (NW Spain). En Smayda, T.J., Shimizu, Y. (Eds.), *Toxic phytoplankton blooms in the sea*. Editorial Elsevier, New York, pp. 553-558.
- Rehmann, N., Hess, P., Quilliam, M.A. 2008. Discovery of new analogs of the marine biotoxin azaspiracid in blue mussels (*Mytilus edulis*) by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22: 549-558.
- Ren, X.Q., Furukawa, T., Haraguchi, M., Sumizawa, T., Aoki, S., Kobayashi, M., Akiyama, S. 2004. Function of the ABC signature sequences in the human multidrug resistance protein 1. *Mol. Pharmacol.*, 65: 1536-1542.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245: 1066-1073.
- Ritter, C.A., Jedlitschky, G., Meyer zu Schwabedissen, H., Grube, M., Köck, K., Kroemer, H.K. 2005. Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab. Rev.*, 37: 253-278.
- Ritz, V., Marwitz, J., Richter, E., Ziemann, C., Quentin, I., Steinfelder, H.J. 1997. Characterization of two pituitary GH3 cell sublines partially resistant to apoptosis induction by okadaic acid. *Biochem. Pharmacol.*, 54: 967-971.
- Roepke, T.A., Hamdoun, A.M., Cherr, G.N. 2006. Increase in multidrug transport activity is associated with oocyte maturation in sea stars. *Dev. Growth Differ.*, 48: 559-573.
- Rossignoli, A.E., Blanco, J. 2010. Subcellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*: first evidences of lipoprotein binding to okadaic acid. *Toxicon*, 55: 221-226.
- Rossignoli, A.E., Blanco, J. 2008. Cellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Toxicon*, 52: 957-959.

- Ryu, S., Kawabe, T., Nada, S., Yamaguchi, A. 2000. Identification of basic residues involved in drug export function of human multidrug resistance-associated protein 2. *J. Biol. Chem.*, 275: 39617-39624.
- Sandal, T., Ahlgren, R., Lillehaug, J., Døskeland, S.O. 2001. Establishment of okadaic acid resistant cell clones using a cDNA expression library. *Cell Death Differ.*, 8: 754-766.
- Sanjuan, A., Quesada, H., Zapata, C., Álvarez, G. 1990. On the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. On NW coasts of the Iberica Peninsula. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 143: 1-14.
- Sanjuan, A., Zapata, C., Álvarez, G. 1994. *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus edulis* on the coasts of the Iberica Peninsula. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 13: 131-146.
- Satake, M., MacKenzie, L., Yasumoto, T. 1997. Identification of *Protoceraium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Nat. Toxins*, 5: 164-167.
- Satake, M., Ofuji, K., Naoki, H., James, K.J., Furey, A., McMahon, T., Silke, J., Yasumoto, T. 1998. Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from irish mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 9967-9968.
- Sauerborn, R., Polancec, D.S., Zaja, R., Smital, T. 2004. Identification of the multidrug resistance-associated protein (mrp) related gene in red mullet (*Mullus barbatus*). *Mar. Environ. Res.*, 58: 199-204.
- Sauerborn, R., Zaja, R., Franjević, D., Brozović, A., Smital, T. 2010. Presence of ecotoxicologically relevant Pgp and MRP transcripts and proteins in Cyprinid fish. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 61: 175-182.
- Saurin, W., Hofnung, M., Dassa, E. 1999. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-Binding Cassette (ABC) Transporters. *J. Mol. Evol.*, 48: 22-41.
- Savary, S., Denizot, F., Luciani, M., Mattei, M., Chimini, G. 1996. Molecular cloning of a mammalian ABC transporter homologous to *Drosophila* white gene. *Mamm. Genome*, 7: 673-676.
- Schantz, E.J., Mold, J.D., Howard, W.L., Bowden, J.P., Stanger, D.W., Lynch, J.M., Wintersteiner, O.P., Dutcher, J.D., Walters, D.R., Riegel, B. 1961. Paralytic shellfish poison. VIII. Some chemical and physical properties of purified clam and mussels poisons. *Can. J. Chem.*, 39: 2117-2123.
- Schaub, T.P., Kartenbeck, J., König, J., Spring, H., Dörsam, J., Staehler, G., Störkel, S., Thon, W.F., Keppler, D. 1999. Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10: 1159-1169.

- Scheffer, G.L., Kool, M., de Haas, M., de Vree, J.M., Pijnenborg, A.C., Bosman, D.K., Elferink, R.P., van der Valk, P., Borst, P., Scheper, R.J. 2002. Tissue distribution and induction of human multidrug resistant protein 3. *Lab. Invest.*, 82: 193-201.
- Schmitt, L., Tampé, R. 2002. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 12: 754-760.
- Schneider, E., Hunke, S. 1998. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22: 1-20.
- Schröder, H.C., Badria, F.A., Ayyad, S.N., Batel, R., Wiens, M., Hassanein, H.M., Kurelec, B., Müller, W.E. 1998. Inhibitory effects of extracts from the marine alga *Caulerpa taxifolia* and of toxin from *Caulerpa racemosa* on multixenobiotic resistance in the marine sponge *Geodia cydonium*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 5: 119-126.
- Senior, A.E., al-Shawi, M.K., Urbatsch, I.L. 1995. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett.*, 377: 285-289.
- Shi, Z., Jain, S., Kim, I.W., Peng, X.X., Abraham, I., Youssef, D.T., Fu, L.W., El Sayed, K., Ambudkar, S.V., Chen, Z.S. 2007. Siphonol A, a marine-derived siphonane triterpene, potently reverses P-glycoprotein (ABCB1)-mediated multidrug resistance in cancer cells. *Cancer. Sci.*, 98: 1373-1380.
- Shigeta, J., Katayama, K., Mitsuhashi, J., Noguchi, K., Sugimoto, Y. 2010. BCRP/ABCG2 confers anticancer drug resistance without covalent dimerization. *Cancer. Sci.*, 101: 1813-1821.
- Shukle, R.H., Yoshiyama, M., Morton, P.K., Johnson, A.J., Schemerhorn, B.J. 2008. Tissue and developmental expression of a gene from Hessian fly encoding an ABC-active-transporter protein: implications for Malpighian tubule function during interactions with wheat. *J. Insect Physiol.*, 54: 146-154.
- Shumway, S.E., Cembella, A.D. 1993. The impact of toxic algae on scallop culture and fisheries. *Rev. Fish. Sci.*, 1: 121-150.
- Shyamala, V., Baichwal, V., Beall, E., Ames, G.F. 1991. Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J. Biol. Chem.*, 266: 18714-18719.
- Silvert, W., Bricelj, M., Cembella, A. 1998. Dynamic modelling of PSP toxicity in the surfclam (*Spisula solidissima*). En Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia e Intergovernmental Oceanographic Commission (UNESCO), Galicia, pp. 437-440.
- Situ, D., Haimeur, A., Conseil, G., Sparks, K.E., Zhang, D., Deeley, R.G., Cole, S.P. 2004. Mutational analysis of ionizable residues proximal to the cytoplasmic interface of membrane spanning domain 3 of the multidrug resistance protein,

- MRP1 (ABCC1): glutamate 1204 is important for both the expression and catalytic activity of the transporter. *J. Biol. Chem.*, 279: 38871-38880.
- Skibinski, D.O., Gallagher, C., Beynon, C.M. 1994. Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics*, 138: 801-809.
- Smital, T., Sauerborn, R., Pivcević, B., Krca, S., Kurelec, B. 2000. Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 126: 175-186.
- Smith, A.J., van Helvoort, A., van Meer, G., Szabó, K., Welker, E., Szakacs, G., Váradi, A., Sarkadi, B., Borst, P. 2000. MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J. Biol. Chem.*, 275: 23530-23539.
- Smith, C.A., Rayment, I. 1996. Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins. *Biophys. J.*, 70: 1590-1602.
- Stabell, O.B., Steffenak, I., Aune, T. 1992. An evaluation of the mouse bioassay applied to extracts of 'diarrhoetic' shellfish toxins. *Food Chem. Toxicol.*, 30: 139-144.
- Stefano, G.B., Cadet, P., Sinisterra, J., Charles, J., Kuruvilla, S., Aiello, E. 1990. Functional neuroanatomy of *Mytilus edulis*: monoaminegic and opioid localisation. En Stefano, G.B. (Ed.), *Neurobiology of Mytilus Edulis*. Editorial Manchester University Press, Manchester, pp. 38-56.
- St-Pierre, M.V., Serrano, M.A., Macias, R.I., Dubs, U., Hoechli, M., Lauper, U., Meier, P.J., Marin, J.J. 2000. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279: R1495-1503.
- Sturm, A., Cunningham, P., Dean, M. 2009. The ABC transporter gene family of *Daphnia pulex*. *BMC Genomics*, 10: 170-188.
- Suárez-Gómez, B., Souto, M.L., Norte, M., Fernández, J.J. 2001. Isolation and structural determination of DTX-6, a new okadaic acid derivative. *J. Nat. Prod.*, 64: 1363-1364.
- Subba Rao, D.V., Quilliam, M.A., Pocklington, R. 1988. Domoic acid - A neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. *J. Fish Aquat. Sci.*, 45: 2076-2079.
- Suganuma, M., Fujiki, H., Suguri, H., Yoshizawa, S., Hirota, M., Nakayasu, M., Ojika, M., Wakamatsu, K., Yamada, K., Sugimura, T. 1988. Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 1768-1771.

- Suzuki, T., Igarashi, T., Ichimi, K., Watai, M., Suzuki, M., Ogiso, E., Yasumoto, T. 2005. Kinetics of diarrhetic shellfish poisoning toxins, okadaic acid, dinophysistoxin-1, pectenotoxin-6 and yessotoxin in scallops *Patinopecten yessoensis*. *Fish. Sci.*, 71: 948-955.
- Suzuki, T., Mitsuya, T. 2001. Comparison of dinophysistoxin-1 and esterified dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) contents in the scallop *Patinopecten yessoensis* and the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, 39: 905-908.
- Suzuki, T., Ota, H., Yamasaki, M. 1999. Direct evidence of transformation of dinophysistoxin-1 to 7-O-acyl-dinophysistoxin-1 (dinophysistoxin-3) in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Toxicon* 37: 187-198.
- Svensson, S., Förlin, L. 1998. Intracellular effects of okadaic acid in the blue mussel *Mytilus edulis*, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Mar. Environ. Res.*, 46: 449-452.
- Svensson, S., Särngren, A., Förlin, L. 2003. Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane p-glycoprotein activity (multixenobiotic resistance). *Aquat. Toxicol.*, 65: 27-37.
- Taguchi, Y., Kino, K., Morishima, M., Komano, T., Kane, S.E., Ueda, K. 1997. Alteration of substrate specificity by mutations at the His⁶¹ position in predicted transmembrane domain 1 of human MDR1/P-glycoprotein. *Biochemistry*, 36: 8883-8889.
- Takahashi, K., Kimura, Y., Nagata, K., Yamamoto, A., Matsuo, M., Ueda, K. 2005. ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis. *Med. Mol. Morphol.*, 38: 2-12.
- Tammur, J., Prades, C., Arnould, I., Rzhetsky, A., Hutchinson, A., Adachi, M., Schuetz, J.D., Swoboda, K.J., Ptáček, L.J., Rosier, M., Dean, M., Allikmets, R. 2001. Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12. *Gene*, 273: 89-96.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731-2739.
- Tan, B., Piwnicka-Worms, D., Ratner, L. 2000. Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr. Opin. Oncol.*, 12: 450-458.
- Tanaka, J., Trianto, A., Musman, M., Issa, H.H., Ohtani, I.I., Ichiba, T., Higa, T., Yoshida, W.Y., Scheuer, P.J. 2002. New polyoxygenated steroids exhibiting reversal of multidrug resistance from the gorgonian *Isis hippuris*. *Tetrahedron*, 58: 6259-6266.

- Taniguchi, K., Wada, M., Kohno, K., Nakamura, T., Kawabe, T., Kawakami, M., Kagotani, K., Okumura, K., Akiyama, S., Kuwano, M. 1996. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.*, 56: 4124-4129.
- Taniyama, S., Arakawa, O., Terada, M., Nishio, S., Takatani, T., Mahmud, Y., Noguchi, T. 2003. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus ovifrons*. *Toxicon*, 42: 29-33.
- Tarr, P.T., Edwards, P.A. 2008. ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *J. Lipid Res.*, 49: 169-182.
- Tauc, L. 1966. Physiology of the nervous system. En Wilbur, K., Yonge, C.M. (Eds.), *Physiology of the Mollusca*. Editorial Academic Press, New York, pp. 387-441.
- Thiagalingam, S., Grossman, L. 1993. The multiple roles for ATP in the *Escherichia coli* UvrABC endonuclease-catalyzed incision reaction. *J. Biol. Chem.*, 268: 18382-18389.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., Pfaffl, M.W. 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.*, 31: e122.
- Tillmann, U., Elbrächter, M., Krock, B., John, U., Cembella, A. 2009. *Azadinium spinosum* gen. et sp. nov. (*Dinophyceae*) identified as a primary producer of azaspiracid toxins. *Eur. J. Phycol.*, 44: 63-79.
- Tohda, H., Yasui, A., Yasumoto, T., Nakayasu, M., Shima, H., Nagao, M., Sugimura, T. 1994. Chinese hamster ovary cells resistant to okadaic acid express a multidrug resistant phenotype. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203: 1210-1216.
- Tomblin, G., Bartholomew, L., Gimi, K., Tyndall, G.A., Senior, A.E. 2004. Synergy between conserved ABC signature Ser residues in P-glycoprotein catalysis. *J. Biol. Chem.*, 279: 5363-5373.
- Tripuraneni, J., Koutsouris, A., Pestic, L., De Lanerolle, P., Hecht, G. 1997. The toxin of diarrhetic shellfish poisoning, okadaic acid, increases intestinal epithelial paracellular permeability. *Gastroenterology*, 112: 100-108.
- Urbatsch, I.L., Julien, M., Carrier, I., Rousseau, M.E., Cayrol, R., Gros, P. 2000. Mutational analysis of conserved carboxylate residues in the nucleotide binding sites of P-glycoprotein. *Biochemistry*, 39: 14138-14149.
- Vale, P., Sampayo, M.A. 1999. Esters of okadaic acid and dinophysistoxin-2 in Portuguese bivalves related to human poisonings. *Toxicon*, 37: 1109-1121.

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.*, 3: RESEARCH0034.
- Vanhuyse, M., Kluza, J., Tardy, C., Otero, G., Cuevas, C., Bailly, C., Lansiaux, A. 2005. Lamellarin D: a novel pro-apoptotic agent from marine origin insensitive to P-glycoprotein-mediated drug efflux. *Cancer Lett.*, 221: 165-175.
- Vasconcelos, V.M., Wiegand, C., Pflugmacher, S. 2007. Dynamics of glutathione-S-transferases in *Mytilus galloprovincialis* exposed to toxic *Microcystis aeruginosa* cells, extracts and pure toxins. *Toxicon*, 50: 740-745.
- Vázquez, V.J.M. 1975. Estudio de la fauna marina de los concheros de los castros de A Peneda y Montealegre (Pontevedra). *Gallaecia* 1: 141-146.
- Venn, A.A., Quinn, J., Jones, R., Bodnar, A. 2009. P-glycoprotein (multi-xenobiotic resistance) and heat shock protein gene expression in the reef coral *Montastraea franksi* in response to environmental toxicants. *Aquat. Toxicol.*, 93: 188-195.
- Vulevic, B., Chen, Z., Boyd, J.T., Davis, W.Jr., Walsh, E.S., Belinsky, M.G., Tew, K.D. 2001. Cloning and characterization of human adenosine 5'-triphosphate-binding cassette, sub-family A, transporter 2 (ABCA2). *Cancer Res.*, 61: 3339-3347.
- Wang, H., Lee, E.W., Cai, X., Ni, Z., Zhou, L., Mao, Q. 2008. Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) determined by epitope insertion and immunofluorescence. *Biochemistry*, 47: 13778-13787.
- Wang, N., Ranalletta, M., Matsuura, F., Peng, F., Tall, A.R. 2006. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26: 1310-1316.
- Wang, S.J., Scavetta, R., Lenz, H.J., Danenberg, K., Danenberg, P.V., Schönthal, A.H. 1995. Gene amplification and multidrug resistance induced by the phosphatase-inhibitory tumor promoter, okadaic acid. *Carcinogenesis*, 16: 637-641.
- Weinstein, J.E. 1995. Fine structure of the digestive tubule of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). *J. Shellfish Res.*, 14: 97-103.
- Westlake, C.J., Cole, S.P., Deeley, R.G. 2005. Role of the NH₂-terminal membrane spanning domain of multidrug resistance protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking. *Mol. Biol. Cell* 16, 2483-2492.
- Westlake, C.J., Qian, Y.M., Gao, M., Vasa, M., Cole, S.P., Deeley, R.G. 2003. Identification of the structural and functional boundaries of the multidrug resistance protein 1 cytoplasmic loop 3. *Biochemistry*, 42: 14099-14113.

- Whalen, K.E., Sotka, E.E., Goldstone, J.V., Hahn, M.E. 2010. The role of multixenobiotic transporters in predatory marine molluscs as counter-defense mechanisms against dietary allelochemicals. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 152: 288-300.
- Wiegand, C., Pflugmacher, S., Oberemm, A., Meems, N., Beattie, K.A., Steinberg, C.E.W., Codd, G.A. 1999. Uptake and effects of microcystin-LR on detoxication enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol.*, 14: 89-95.
- Williams, A.B., Jacobs, R.S. 1993. A marine natural product, patellamide D, reverses multidrug resistance in a human leukemic cell line. *Cancer Lett.*, 71: 97-102.
- Windust, A.J., Quilliam, M.A., Wright, J.L., McLachlan, J.L. 1997. Comparative toxicity of the diarrhetic shellfish poisons, okadaic acid, okadaic acid diol-ester and dinophysistoxin-4, to the diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Toxicon*, 35: 1591-1603.
- Windust, A.J., Hu, T., Wright, J.L.C., Quilliam, M.A., McLachlan, J.L. 2000. Oxidative metabolism by *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae) of a diol-ester of okadaic acid, the diarrhetic shellfish poisoning. *J. Phycol.*, 36: 342-350.
- Xu, C., Li, C.Y., Kong, A.N. 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.*, 28: 249-268.
- Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S., Zhang, J.T. 2004. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J. Biol. Chem.*, 279: 19781-19789.
- Yasumoto, T., Igarashi, T., Satake, M. 2001. Chemistry of phycotoxins-structural elucidation. En De Koe, W.J., Samson, R.A., Van Egmond, H.P., Gilbert, J., Sabino, M. (Eds.), *Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium. proceedings of the X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*. Editorial Wageningen, Netherlands, pp. 465-474.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Matsumoto, G.K., Clardy, J. 1984. Diarrhetic shellfish poisoning. En Ragelis, E.P. (Ed.), *Seafood Toxins. ACS Symposium. American Chemical Society*. Editorial Washington, pp. 207-214.
- Yasumoto, T., Murata, M., Oshima, Y., Sano, M., Matsumoto, G.K., Clardy, J. 1985. Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41: 1019-1025.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Sugawara, W., Fukuyo, Y., Oguri, H., Igarashi, T., Fujita, N. 1980. Identification of *Dinophysis fortii* as the causative organism of diarrhetic shellfish poisoning. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46: 1405-1411.
- Yasumoto, T., Oshima, Y., Yamaguchi, M. 1978. Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tohoku district. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 44: 1249-1255.

- Young, J., Holland, I.B. 1999. ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochim. Biophys. Acta*, 1461: 177-200.
- Yusa, K., Tsuruo, T. 1989. Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer Res.*, 49: 5002-5006.
- Zaja, R., Klobucar, R.S., Smital, T. 2007. Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Aquat. Toxicol.*, 81: 365-376.
- Zaja, R., Munić, V., Klobucar, R.S., Ambriović-Ristov, A., Smital, T. 2008a. Cloning and molecular characterization of apical efflux transporters (ABCB1, ABCB11 and ABCC2) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol.*, 90: 322-332.
- Zaja, R., Munić, V., Smital, T. 2008b. Cloning and mRNA expression analysis of an ABCG2 (BCRP) efflux transporter in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and primary hepatocytes. *Mar. Environ. Res.*, 66: 77-79.
- Zelcer, N., Saeki, T., Reid, G., Beijnen, J.H., Borst, P. 2001. Characterization of drug transport by the human multidrug resistance protein 3 (ABCC3). *J. Biol. Chem.*, 276: 46400-46407.
- Zhang, D.W., Cole, S.P., Deeley, R.G. 2001. Identification of a nonconserved amino acid residue in multidrug resistance protein 1 important for determining substrate specificity: evidence for functional interaction between transmembrane helices 14 and 17. *J. Biol. Chem.*, 276: 34966-34974.
- Zhang, D.W., Nunoya, K., Vasa, M., Gu, H.M., Theis, A., Cole, S.P., Deeley, R.G. 2004. Transmembrane helix 11 of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1): identification of polar amino acids important for substrate specificity and binding of ATP at nucleotide binding domain 1. *Biochemistry*, 43: 9413-9425.
- Zhao, Q., Chang, X.B. 2004. Mutation of the aromatic amino acid interacting with adenine moiety of ATP to a polar residue alters the properties of multidrug resistance protein 1. *J. Biol. Chem.*, 279: 48505-48512.
- Zhao, S., Fernald, R.D. 2005. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Comput. Biol.*, 12: 1047-1064.
- Zhou, D., Hardt, W.D., Galán, J.E. 1999. *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect. Immun.*, 67: 1974-1981.

- Zhou, J., Fritz, L. 1994. Okadaic acid antibody localizes to chloroplasts in the DSP-toxin-producing dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum maculosum*. *Phycologia*, 33: 455-461.
- Zhou, J., He, W.Y., Wang, W.N., Yang, C.W., Wang, L., Xin, Y., Wu, J., Cai, D.X., Liu, Y., Wang, A.L. 2009. Molecular cloning and characterization of an ATP-binding cassette (ABC) transmembrane transporter from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 150: 450-458.
- Zouros, E., Oberhauser Ball, A., Saavedra, C., Freeman, K.R. 1994. An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 7463-7467.
- Zucchi, S., Corsi, I., Luckenbach, T., Bard, S.M., Regoli, F., Focardi, S. 2010. Identification of five partial ABC genes in the liver of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* and sensitivity of ABCB1 and ABCC2 to Cd exposure. *Environ. Pollut.*, 158: 2746-2756.





8. ANEXOS



>MR2-F1/MR2-R1

AAAGACGGACTGGATCACCATTGTTCTGAAGGAGGAGATAACCTAAGTGTGGTCAACGACAATTAATCTGTCTTGCAAGAGCCTTAC
TGAGAAAGACTAAAATTTTAGTACTTGTATGAGGCAACCGCTGCTGTTGATTTGGAAACAGATGACCTTATACAGACCACCATTAGAAC
AGAATTTGCAGACTGCACTATACCTAATAGCTCAGACTCAATACAATAATGGACTATACCTAGAATTATGGTATTAGATTGTGGA
CAATCAGGGAATTCGACTCACCACCAATTT

>MR2-F2

GATGAGGCAACCGCTGCTGTTGATTTGGAAACAGATGACCTTATACAGACCACCATTAGAACAGAATTTGCAGACTGCACTATACCTAA
CTATAGCTCAGAGACTCAATACAATAATGGACTATACCTAGAATTATGGTATTAGATTGTGGACAAATCAGGGAATTCGACTCACCAG
CAATTTACTATTAGATAAGAAGAGTATATTTTATGGTATGTCAAAGATGCCGGCTTGGTGTCTTGATGATAATGGTATTAAAGTCTT
TGATAAATAGATTTTATGTAAAAATATATTTTTTTTCCAATAAATCTTTTGACAAAAA

>MRP2 DGF

CATGGATAATGAATACAAAGTTTACAACAAAACATTCTTTTCGGAGAAGACCTGGACAAGAGGAAGTACGAATTCATTGTAGATGCATC
 AGCTCTTAGAAAAGACTTAGAAGTGTACCTGGAGGGGACCAACAGAAATTTGGCGAAAAGGGCATAAAATTTAAGTGGTGGACAAAAG
 CAGAGAGTCAGTTTGGCCCGTGTGTATCAGAATGCTGACATATATTTACTGGACGATTCTTTAAGTGTCTTGGACGACATGTTG
 GCAACACATTTTGTGAAATCATAGGCTCAATGGGCTTTTAAAGAAAAGACAAGAATACTTGTACGCATGGTTTAAATTACAT
 ACGGAAAGTCGACATCATATAACAATGGTGGATGGCCGAATCGGAGAAATAGGATCATTTGATGAACTCACTGAACACGATGGACCT
 TTTGCAGGATTCATGAAAAATTTTGGCGGAAGAACTGAGTACTGATGATGAACAAAACATAGTTTCGTACAGAAAATTAGAAGGAA
 AATCAACCACCTGACGAGACAATATCCATAGTACACATTCAGATATTGTACACAGTATAAGTGATAATTCAAAATATACCAATAGCCAG
 ACAGATGTCACGACAGACGTCATGTGAGAGCGAGTCATCGGAAGTTTATACATAATACATTAGTACAGGAGGAGAATACAGAGTCA
 GGATCGGTAAATTAACGTCGATTATGACCTATGTAAGAGCTTTGGCGTTAAGATTGTAATAGTTATTAACAATGAGTATGGTTC
 ATGAAGTTGCCGAGATGTATTTAGATGTGTGGCTTAGTAAATGGACACGAGACCATACAAACGGAACAGTTAATGGAACCTAAAGAAA
 CAGGAGACTTGAATTTATGGAGCTATAGGACTTTTTAGAGTGTGTCAATCTTTATTACGGAACCTTTGTACTTATGGACTGATA
 AAGGCAACTAGAAAATCCATAAAAAATTTGTTACGTAACATTTCTGAGATCACCATGAGTTTTTTCGATACCACACCGGTAGGCAGGA
 TTGTAATCGGTTCTCGAAGGATATAGAAACCATAGACGACGAACCTGATCTACAGTTTAAAGACGTGGTCATATGTTTGTCTTAGT
 TTTGTGTAATACAGTCATCATTAGCACTGGGACACCTCAGTTCTTATTTATAATGCTTCCAGTCACGGTTGTGTATTTTCGCTTACAG
 CGCTTGTACGTTTCGACATCTCGACAATTAAGGACGATGGCATCAGCAGCTCGATCCCTGTATTTTACACCTTTGGGGAACCATTT
 CTGGATGTTTCGACAATCCGGGCTTTCAACAAGAGAAAAGATTTATGACTGAATCAGCAGCTCGATTTGATGAACTCAACACACGTCG
 TTTCTTTGACGATCACTGTTGAAAAGTGGTTACATATCCGACTAGACTGGTTAGGAAGCATTATAGTATTGTGTGTTTGGCTGCTAGTT
 GTAGTAAATAAGGACGATATCTCACCAGGGATAGTTGGTTTGGCTATTACGTACGCTTTGAATGTGACTAATTCGATCGAATGGTTGG
 TAAAGTTAATACGAATGCAGAAACGAATATATATCTCTAGAGAGAACTCAAGAATACTCAGAAACACATACAGAGGCTGATGGAT
 AGTGGAAAATAAAGACGAGAACATGATTGGCCAAACGAAGGAAATGTTGAAATGGACAATTTAGGTGTTTCGTATAGGGAAGGTCTT
 GAATTAATTTTGAAGACATCTCATGTAAATAGCTCCATGTGAAAAGATTTGGTATTGTTGGTTCGAACAGGAGCTGGGAAGTCCCTCAT
 TAACCATGGGCTGTTTCAAGATTTATAGAAAAGCTCAAGGACGATTTCTTATAGATGGGATCGACATTTCTACGATAGGACTTCATGA
 TCTGAGATCAAGATTACTATATACACAGGATCCAGTTTGTGTTTCTGGAACAATGAGAATGAACCTGGATCCGTTTGTATGAATAC
 TCTAACGAAGACATTTGGACAGCCCTCAACCATGCACATCTGAAAGCCTTTGTGATCGGTTTAAAGACGGAAGTGGATCACCATTGTT
 CTGAAGGAGGAGATAACCTAAGTGTTCGACGACATTAATCTGCTTGAAGAGCCTTACTGAGAAAGACTAAAATTTTAGTACT
 TGATGAGGCAACCGCTGCTGTTG

>MRPmAf/MRPmAr

CGGAGAAGACCTGGACAAGAGGAAGTACGAATTCATTGTAGATGCATCAGCTCTTAGAAAAGACTTAGAAGTGTACCTGGAGGGGAC
CAAAACAGAAATTTGGCGAAAAGGGCATAAAATTTAAGTGGTGGACAAAAGCAGAGAGTCAGTTTGGCCCGTGTGTATCAGAATGCTG
ACATATATTTACTGGACGATTTCTTAAAGTGTGTGACGCACATGTTGGCAACACATTTTGTGTAATCATAGGCTCAAATGGGCT
TTTAAAGAAAAGACAGAATACTTGTACGCATGGTTAAATTACATACGGAAGTCGACATCATATAACAATGGTGGATGGCCGA
ATCGGAGAAATAGGATCATTGATGAACTCACTGAACACGATGGACCTTTTGCAGGATTCATGAAAAATTTTGGCGGAAGAACTGA
GTACTGATGATGAACAAAACATAGTTTCGTACAGAAAATTAGAAGGAAAATCAACCACTGACGAGACAATATCCATAGTACACATTC
AGATATTGTACACAGTATAAGTGATAATTCAAATATACCAATAGCCAGACAGATGTCACGACAGACGTCATGTGAGAGCGAGTCATCG
GAAGTTTATACATAATACATTAGTACAGGAGGAGAATACAGAGTCAGGATCGGTAATTAACCTGATTATGACCTATGTAAGAG
CTGTTGGCGTTAAGATTGTAATAGTTATATTAACAATGAGTATGGTTTCATGAAGTTGCCGAGATGATTTAGATGTGTGGCTTAGTAA
ATGGACACGAGACCATACAAACGGAACAGTTAATGGAACCTCAAGAAAACAGGAGACTTGGAAATTTATGGAGCTATAGGACTTTTGA
GGTGTGTCAATCTTTATACGGAACCTTTGTACTTATGGACTGATAAAGGCAACTAGAAAATCCATAAAAAATTTGTACGTAACA
TTCTGAGATCACCATGAGTTTTCGATACCAACCCGGTAGGCAGGATTGTAATCGGTTCTCGAAGGATATAGAAAACCATAGACGA
CGAAGTATCTACAGTTTAAAGACGTTGGTCATATGTTTGTATTTAGTATTGTAATACAGTCATCATTAGCACTGGGACACCTCAG
TTCTTATTTTATAATGCTTCCAGTCACGGTTGTGATTTTCGCTTACAGCGCTTGTACGTTTCGACATCTCGACAATTAAGGACGATGG
CATCAGCAGCTCGATCCCTGTATTTTACACCTTTGGGGAACCATTTCTGGATGTTTCGACAATCCGGGCTTTCAACAAGAGAAAAG
ATTTATGACTGAATCAGCAGCTCGAT

Figura A1. Secuencias de los fragmentos del gen *mrp1* de *Mytilus galloprovincialis*. Los cebadores aparecen subrayados.

>MRPPmBf /MRPPmBr

CACGAGACCATACAAACGGAAACAGTTAATGGAACCTCAAAGAAACAGGAGACTTGGAAATTTATGGAGCTATAGGACTTTTTAGAGGTGT
GTCAATCTTTATTACGGAAACCTTTGTTACTTATGGACTGATAAAGGCAACTAGAAAACTCCATAAAAAATTTGTTACGTAAACATTCTG
AGATCAACCAATGAGTTTTTTCGATACCACACCGGTAGGCAGGATTGTAAATCGGTTCTCGAAGGATATAGAAACCATAGACGACGAAC
TGATCTACCAGTTTAAAGACGTGGTCATATGTTTGCTATTAGTTTTGTGTAATACAGTCATCATTAGCACTGGGACACCTCAGTTCTT
ATTTATAATGCTTCCAGTCACGTTGTGTATTTTCGCTTACAGCGCTTGTACGTTTCGACATCTCGACATTAAGGACGATGGCATCA
GCAGCTCGATCCCCTGTATTTTCACACTTTGGGGAAACCATTTCTGGATGTTTCGACAAATCCGGGCCTTTCAACAAGAGAAAAGATTTA
TGCTGAATCGACAGTCGATTGATGAACCTCAACACAGCTCGTTCTTGCACGATCAGTTGAAAAGTGTTACATATCCGACTAGA
CTGGTTAGGAAGCATTATAGTATTGTGTGTTTGCCTGCTAGTTGTAGTAAATAAGGACGATATCTCACCAGGGATAGTTGGTTTGGCT
ATTACGTACGCTTTGAATGTGACTAATTGCATCGAATGGTTGGTAAAGTTAACTACGAATGCAGAAACGAATATATATATCTCTAGAGA
GAATCAAGAATACTCAGAAACATACAGAGGCTGATTGGATAGTGGAAAATAAAGACCAGAACATGATTGGCCAAACGAAGGAAA
TGTTGAAATGGACAATTATGGTGTTCGCTATAGGGAAGGCTCTTGAATTAGTTTTGAAAAGCATCTCATGTAAAAATAGCTCCATGTGAA
AAGATTGGTATTGTTGGTTCGAACAGGAGCTGGGAAGTCTCATTAACCATGGGCTGTTTCAGAAATATAGAAAAAGCTCAAGGACGGA
TTCTTATAGATGGGATCGACATTCTACGATAGGACTTCATGATCTGAGATCAAAGATTACTATATACACAGGATCCAGTTTTGTT
TTCTGGAACAATGAGAATGAACCTGGATCCGTTTGATGAATGCTCTAAGCAAGACATTGGACAGCCCTCAACCATGCACATCTGAAA
GCTTTGTGATCGGTTTTAAAGACGCGACTGGATCACCATTGTTCTGAGAGGAGATACCTAAGTGTGGTCAACGACAATTAATCT
GTCTTGCAAGAGCCTTACTGAGAAAGACTAAAAATTTAGTACTTGATGAGGCAACCGCTG

>MRP C F2/MRP Luk R

CTGGAAAGGTTACATACCTCGCTATCCTTATGTTTTCTGTCTCAATATTCAAATCAGTTGTTTTGAATATTCATATTAATGAAACACAA
GAAGCAGGAAGGAGTAACCTGGGTAGCTCTTACTGCTGCCATTTATAAAAAGACTCTGAGACTCACTAATGCAGCTAAGCAAGATTCTA
CTGTAGGCGAGATCATCAACTTGATGTCTGTTGATGCTGAAAAGATAGGAAATGTATGTGGAGTGTCAATGAAGTATGGGCCGTTCC
TCTGTTATTTTCAATATCTTTTTACTTCTGTGGCAAACTTAGGACCTCAGTCTTGGTTGGCTTATAAATTAATCTATTTGTTA
CCAGTTAATTTTGTGTTGATGAGGAAATCAAACATTTGCAATTGGAGAGCATGAATTTAAAAGACGCAAGAATAAAAAGATGAATG
AAGCTCTTAAATGGAATTAAGTTTTTAAAGATGTATGCAATGGGAGGAATGTTTTGAGAAGCGCATTTTAGAAATTCGAGACAAAGCAT
ACATATACTAGCAGGACGAAAAGGAATTCAAAATTGGATGCATGTGATATGGGCAACGACGCCTTTTATGATATCTTTGTGTACCTTC
GGAACGTACGTGTTAATGGATGCCAATAATGTGATGTGACGAGAAAAGGTGTTTGTATCTCTATCACTGTTCAATATACTTCAATATT
CACTACATCTTTTACCACACGTCATCAACTATTTTATCCAGACAGCTGTTTCTTTAAAAAGAATACAAAACCTTTCTGAACAACGAAGA
GCTGGATACAAAGTATAATAAACAAGAAATACATAATTGCAATATGGAAATACAGTTGAAGACGGAACATTATTTGGGATCAACCATG
GAACCAACTTTGAAAGACATTACATTCAAATACCACAAGGATCACTTGTAGCAATAGTGGGTTCGTTGGGAGCAGGGAAGTCTCGT
TGTTGTGAGCCACTTGGAGAAATGGAATCAGAAACAGCGAAAGTTAATATTAAAGGGTTCGATTGCATATGTTGCTCAACAGCCATG
GATAATGAATACAAAGTTTACAACAAAACATTCTTTTCGGAGAAGACCTGGACAAGAGGAAGTACGAATTCATTGTAGATGCATCAGCT
CTTAGAAAAGACTTAGAAGTGTTACCTGGAGGGGACCAACAGAAATTGGCGAAAAGGGCATAAATTTAAGTGGTGGACAAAAGCAGA
GAGTCAGTTTGGCCCGTGC

>MRP D F1/MRP D R1

CGATGGATAACAGTCTTTTCGGTATGCAGTTCACAGTTCAGTTTAAATAGATTTCAGTAACAATAGAAAAGGGACCATCTTTAGCAGAATG
GACACTTGTGCTGTTTGTGTTTTAGGGACACCTCTCCACTTTTTGTATTTCAAACGCAATTTGTGCTAGTACTATTGTTTCAGTACAAATTC
ATTTTAGCAATATTCATCACACTATTAGGCATACTAAGTTTATCCTATGGACTGAGAGATATTCATGACGTTTTGATTGGAGAAAAGT
CTCCTGGTGGTTTTATTTTATCAATTAGTATAGTGTGACAACGATATTGATACACGATGAATCTCATAAAACACAGACGAAGAAAA
GAGAAATTACAGATTTTTCCACATAATTGGACTTTTCTGCAGTTTGGAAATTCGTTTGTGTTTTATTTTTCAAACGAAAGGATAC
GCTGTTGATTTTTCAGAAATAACTGGGAATTACAACCTAACAGAGTGGACACAAAACATATATTGTGTGTTGATAAGTGTGTACCTGATAG
AATCAGCAATACAGGTTTTTAAACAGGTTCTGGGAGCAAAACAGTCTTTTGAAAAGGGTAAAGCAGACAAAGACGTTTCCCCAGAAAT
TAAGGCATCTTTTTTGTGACGGCTCACATGGAGTTGGGTAACGCCATTGTACTTTTTGGATACAGCCATAATCTCGAACCCTCAGAT
TTATGGCCCTTAAACCTGAACATGTATCTACTAATATCATTCCTATTTTCGATAAGTACTGGGAAGAGGAGGTAGAGAAAGCTACAA
GAGAGACAAATCCCAAGAAAAGCGAACGATTAAGACACAACAATTACTGTTGAGAAAAAAGTTCAGGCAAAACCTCCTTCGTTGTGT
TATAAGAGCATTTGGGGCTGCTTTGTTGCTGTGAGCTTTTTACAAATTATTGTATCATTTAGCCGAGTTCACCTTTCCCTATATGATA
AGACTCCTAATTGGCATAGCAAGAGATGGAAGAAAGAGATCTGGAAGGTTACATACCTCGCTATCCTTATGTTTCTGTCTCAATAT
TCAAATCAGTTGTTTTGAATATTCATATTAATGAAACACAAGAAGCAGGAAGGAGTAAGTGGGTAGCTCTTACTGCTGCCATTTATAA
AAGACTCTGAGACTCACTAATGCAGC

>MRP D F1/MRP D R2

CGATGGATAACAGTCTTTTCGGTATGCAGTTCACAGTTCAGTTTAAATAGATTTCAGTAACAATAGAAAAGGGACCATCTTTAGCAGAATG
GACACTTGTGCTGTTTGTGTTTTAGGGACACCTCTCCACTTTTTGTATTTCAAACGCAATTTGTGCTAGTACTATTGTTTCAGTACAAATTC
ATTTTAGCAATATTCATCACACTATTAGGCATACTAAGTTTATCCTATGGACTGAGAGATATTCATGACGTTTTGATTGGAGAAAAGT
CTCCTGGTGGTTTTATTTTATCAATTAGTATAGTGTGACAACGATATTGATACACGATGAATCTCATAAAACACAGACGAAGAAAA
GAGAAATTACAGATTTTTCCACATAATTGGACTTTTCTGCAGTTTGGAAATTCGTTTGTGTTTTATTTTTCAAACGAAAGGATAC
GCTGTTGATTTTTCAGAAATAACTGGGAATTACAACCTAACAGAGTGGACACAAAACATATATTGTGTGTTGATAAGTGTGTACCTGATAG
AATCAGCAATACAGGTTTTTAAACAGGTTCTGGGAGCAAAACAGTCTTTTGAAAAGGGTAAAGCAGACAAAGACGTTTCCCCAGAAAT
TAAGGCATCTTTTTTGTGACGGCTCACATGGAGTTGGGTAACGCCATTGTACTTTTTGGATACAGCCATAATCTCGAACCCTCAGAT
TTATGGCCCTTAAACCTGAACATGTATCTACTAATATCATTCCTATTTTCGATAAGTACTGGGAAGAGGAGGTAGAGAAAGCTACAA
GAGAGAGCAATCCCAAGAAAAGCGAACGATTAAGACACAACAATTACTGTTGAGAAAAAAGTTCAGGCAAAACCTCCTTCGTTGTGT
TATAAGAGCATTTGGGGCTGCTTTGTTGCTGTGAGCTTTTTACAAATTATTGTATCATTTAGCCGAGTTCACCTTTCCCTATATGATA
AGACTCCTAATTGGCATAGCAAGAGATGGAAGAAAGAGATCTGGAAGGTTACATACCTCGCTATCCTTATGTTTCTGTCTCAATAT
TCAAATCAGTTGTTTTGAATATTCATATTAATGAAACACAAGAAGCAGGAAGGAGTAAGTGGGTAGCTCTTACTGCTGCCATTTATAA

>MRP D R4

GGGAAAAACGATATTGAAAAACCCCAACGACGCGGACAAACGATGGATAACAGTCTTTTCGGTATG

Figura A1 (continuación)

>MRPKing F/MRPKing R

GGTGGCGGTTGAAAGAGTAAAGGAATACACTGATATTCCTGCAGAGGCCGAACCTTTATAATGATTATAAGCTTCCTGTAAATACAAAC
CAACAAGGCGTTATAGAGTTTCAACAATACTCCACAAGGTACAGAGATGGACTAAGTCTGGTTTTGAAAAATATCACCTTTAAATAG
AACCAGGAGAAAAGGTTGGAATTGTTGGAAGAACTGGTGCAGGAAAGACATCATTTGTCCCAAGCTATATTTCCG

>MRPKing Nested3 F

CCACAAGGTACAGAGATGGACTAAGTCTGGTTTTGAAAAATATCACCTTTAAATAGAACCCAGGAGAAAAGGTTGGAATTGTTGGAAG
AACTGGTGCAGGAAAGACATCATTGTCCCAAGCTATATTTCCGGTTAATAGAACCTACAACCCGGAAGAATAATTGTTGACGGGGAAGAT
ATATCAATGATGGGCTACATGACTGTAGATCTAAAGTCACCGTTCTACCTCAAGATCCAGTGTATTTTCTGGAAGTCTCCGCATGA
ACATAGATCCAAATGGAACACCACACAGATGATCAAATATGGCGAGCATTAGAACATGCACATATTAAGGATTTTATACAACATTTACC
TTCTAAACTCGATTATGACTGTGGAGAGGGAGGCCAAAATCTCAGCATTGGACAACGTCAGCTTATATCTCTTGTCTAGGAGTATTTCTC
CGTAAATCAAAGATACTGATATTAGATGAAGTACTGCTGCGGTTGATATGGAAGGATGCATTAATACAACAACTATAAGAGAGG
AATTTTCAGAAATGTACTGTTCTTACTATTGCCATCGCCTTAATACAGTTATGGACTATAACAGAATTATGGTACTCGACAACGGAAA
GATAATTCAGTTTGATACCCAGAGAATTTGTTACGACATCTCGGTGGATTGTTTTATCACTTGCAAAGGACTCTGGAATCATCTAA
TTATCATATGAACACCATACTTTGATCATGTTTACATGGATCGTATCTAAATGCTGGGCTATATAATCAACATCTTCATATAAATT
AGGATGCAATATCCCGTTTGTAAATACAAGTCTACAAAAGATTAAAAATGTATAGCCAACTTTCAAACCAATTTTGTACCAAAGA
AACAAATTTGGTAAACATTTTAAATATGTGAAACAAATGAAGACCTTAAATAATTATCAGTTGTACATAGATTATGTAATCGAAATCT
ATAACGTCACCTTCAGTACGTTTAAATTTAGAAAATCTACATACTATTAGGACACAAGAAACAACACTGTCCAAAACATAAAAGTAAC
AACATGGAAGATATCGTTTTTTTCTGTCGTACATTTTGTATAGAGTTTCCAGTGTGAATCTGAAATATCAAAATCTAGAAAATAT
AAATCATTTGTTGTT

>MRPKing Nested5 R

ACTCAAACAGATGATGTAAACTTCTTATGAAGATATGCGAGTCCAAACGCTCTGAGAAACGGAAGCAAACCTAAGTCAGGAAAGCTTTG
TAGAAGTTCTCTGTACAGAAAAGTAACTCACACCGGACGAAACACAGAGGAAGGACATGTACGTTTAAAGCATTTTTATAACCTATGC
AAAAGCCATCGGACTAGTTATAGTGGGGATTATTTCTATTTGTTGATGCCCTATATCAAATATCATCAGTATTAGCGAATATATGGTTA
AGTCAATGGACCTCCGATTCCGTGCTTACCAACAGAACACTTGGAAAACCTGATAGCCATACATATATGGCGAAGAACAATTATTACC
TCCTTGTCTATGGTGGATTGGAATTGCTCAAGCTGTATTTGTTCTCGTTTTTATTGGTATATTTATGGTGCATCAATCACAGCTAC
AAAGTTACTACAGAAAGGCTTCTTCACAGTGTATCAGGTACCAATGTCTATTTTGGACACCACTCTTTTGGTAGAATTGTGAAT
AGATTTTCTGCCGATACAGATACAATAGATAACGATTTACCAACTACTGTTCCAGAAGTGGTTGGAATGTGTTTTTTCAGTGTATTTCAA
CACTTCTCGTCATATCATACAGCACACCTTTATTTTTCGCTGTGATTGTCCCGTTTGGAGTTGCATACTTCTTTTTCAGAGATTTTA
TGTAGCCACTTCACGTCAAGTAAAAAGACTTCAGTCAAGACGCGTTCCCAATTTACAGCCATTTACAGCGAACTATCTCAGGTGCC
ACTGTAATACGTGCTTATTGTGCTGAAAAATCATTCATCAAACATCAAATGACAGAATAAACTCAAATCAAAGATTTCAATATGCAA
TTATAAGTGCTAATAGTGGCTTGAATCCGACTTGAATCTTTGGAATATAATTATATGTTCTGCTGCATTTGTTGGCTGTACTGTC
AAGAGGAAGCATAGAAGGAGCAATCGTCGGATTGTCGATTTCTACGCTTTACAGATGACTGACAACCTGAACTGGTTTGTAGAAATG
ACAAGTGATCTCGAAACAAATATTGTATCGGTTGAAAGAGTAAAGGAATACACTGATATTCCTGCAGAGGCCGAACCTTTATAATGATT
ATAAGCTTCCTGTAAATACAAACCAACAGGC

>MRPKing Nested5 R4

ATTGAATAAATATCTGAACAGCAAAGACCTCAATCCAACCTAATGTTGTGCACAATACTCCAAAAGATGATGCAATTGTAATCGAAGAT
GGAACCTTTTCTGGGATCCAGATGGCGGGAATGCTTCAGAAACATCAACATTACTATACCCGAGAAAAAGTTAGTAGCTGTAGTTG
GTCATGTAGGTTGTGGAATCAAGCTTGCTGCTTCAATATTTGGGAGATATGACCAAAGTCAGGGCAGTGTGAGAGTAAAGGGTAA
AATCAGTTATGTGCCCCAGCAAGCATGGATACAGAATGCAAGTGTGGTAGACAATATTTTATTGGTTGTGAAATGGATCAGAAGAAG
TATAAAGACGTTATGATGCGTGCGCCCTGCGAACAGATTTAGATATATTACCAGCGTCTGATCGTACAGAGTTAGGAGAAAAGGGTA
TTAATTTAAGTGGAGGCCAGAAACAGAGAATTAGTTTAGCCCGAGCTGTATACCATGACACGGACATCTATCTCCTCGATGACCCCT
TAGTTCACTAGATTCTAATGTTGGTAAACATATCTTTGAGAAAGTTATTGGTAACACCGGACTATTATCGGATAAGACGCGGGTTTTG
GTAACCCATGGCTTAAGATGGCTGCCATTTGTAGACAAGATTATTGTAATGGTTGATGGATCTATATCAGAAATAGGAACCTTACGAAG
AACTCCTGTACATGACGGGGCTTTTGCACAGTTTTTGAATAATGATATCATAGAAACAGCAGAAGACGAGGACGACCGGAAAGAGGA
GAAAATAAAACTGATATATCACAAGACTTATTTCTGGCGGATCTGGTGATAACTATGATAGATTATTAGAACTCAAACAGATGAT
GTAAACTTCTTATGAAGATATGCGAGTCCAAACGTC

>MRPKing Nested5 R6

ATATGAAACAGCTAATCACCAGTACCATTACAGAAGCAGAGAGTGAGACCTCGTACTTATTAGTAAAGTCTCATAAAAACATAAAA
TCTCAGCAGCACCAGACCAACCATCCCTGATTAAGGTTCTCTGTAGGACGTTTGTGTACAATTATTTATTGCCAATATTTGGAAGA
TTGTATATGATGTAACGTTGTTTATCTCACCATTCTTTTAAAAATGTAATTGACTATACTGCAGCACCTAAGGATCCAGAAATATC
AAACTTTACTCAGGAATGGAAGGGTACTCTTGTAGTGGCGGCTTCTTTGTTTACAATTCTGATCCAGTCATTAATGTTTCATCAGCAG
TCTTTCTGGAGTATGACCTTGGGAATGAGGGTCAAATCAGCTTTGATGTCAGCTGTGTATCAAAAAGCATAAGAATGACGAGCAGG
CAAGACAGAATCTACTGTCGAGAGATAGTCAACCTAATGTCTATTGATGCACAAAATATACAGGACTTTATAAGTTATTTTGGGT
GTTATGGTCACTCCATTACAAAGTTGTTTTAGTCTTTATTTCTGTATGACACTATGGGTCAATCCATGTGGTCAGGAATTGGTGTT
TTACTTATACTTATTCATTAAATGGTTTCGTCATATCTAAATTCATAAACTACAGGCACAACAGATGAGGCAAAAAGATGAAAGGA
TAAATTTACTAAGTGAAGTTTTAAATGGAATAAGATTTTAAAGATGTATGCCTGGGAAATGGCATTCAAAGATAAAGTGTTAATAAT
TAGGAACATGGAATAAAAATACTTTTAAAGCTGCTATTTATAGAATAGTTATTTTTCAGAGCTGTAGCACCATATTTTGTA
TCACTTGCAACCTTTGTACCTACATATTTATGTATCTGATCATTACTTAGATGCCAAGAAAGCCTTCGTGCGCATTTCTTTATTCA
ACATACTGAGAGTTGCTATAAGTTTTGCTCCGATGGCAGTCAATAAACTATCAAGGCGAGTGTTCCTTTCCACCGATTGAATAATA
TCTGAACAGCAAAGACCTCAATCCAACCTAATGTTGTGC

Figura A2. Secuencias de los fragmentos del gen *mrp2* de *Mytilus galloprovincialis*. Los cebadores aparecen subrayados.

>MRPKing Nested5 R8

GAAACATAATTTAAACGCTGTAGAGATTGTGTTCATGGATAGATTCTGCAACGGGAAACCTCTTTGGGATTCAAATTTGACATGGG
ATGGGGATTGGCCAGAATTCACGGAATGTTTTCAGGACACCATTCTGGTGTGGATTACATCAGGGTGGTTATGGACCACCGCACCTTT
TTACGTTTATCTATTTAGCACAACTTTCTCTACCAGATGTCAGTGGACATGGAAGACATATACAAAACCTGGTTCTTACAGTTTTGT
TTAGCATTACAATCAATGGACGTTGTCTTCGCTGTGAGTAACTAACAAATGATTGGATGAAAGCTTCAGTATTTGCACCAATCATCG
AAGGAATTAATCTCATTTTGATAATGATCTATATAGCGATGGAAAGACAGAAAGGTTTAGTTACATCCGGGATACATTTATTTACTG
GACTCTTAGTTTACTATCCAGCATTATTCATTTTACTCAAAGATTATCAAAAAGGAATATGAAACAAAACCTATTCGAATTTGTTATT
TTCTATTTATCCTTTACTTTTACCGTTATTCATGGATGTCGATAGCATAGCAGAAAACCATCTGCAGCAAAAGGACATGAACCCAG
AACAAGAGTCTTCGTTTTTGTCCAGAATAACATTTAGCTGGATGACTAGATTGATGATGCAAGGGTACAAGAAACCTTTAACAGAAGA
TTCTGTGTTCGGTTTAAACAAAAGAGATACAAGTCAAGAAGCCTACAGTAGATTTTATAACAATGGGTCACAGAATGTGCTTCAGCA
AGCCATGAATATGAAACAGCTAATCACCAGTACCATTTACAAGAAGCAGAGAGTGAGACCTCGTACTTATTAG

Figura A2 (continuación)

>ABCG2 dF/ABCG2 Dr

GGATATGTTGTACAGGATGATGTTGTTATGGGTGGACTGACAGTTCGTGAGAATTTTGAGTTCTCAGCGACTCTAAGATTACCTAGTG
ATGTCACCTAAAGCTGACAGAAAAGACAGAGTAGATAATGTTATAAATGAACCTGGTCTGAACAAATGTGCCGATACTAAGGTTGGAAA
TGAATTTTCCGTTGGTGTATCTGGTGGGAGAAAGAAAAGAACAAATATTGGTATGGAGTTGATTATCTCCCTCCTGTGCTATTTT
GATGAACCAACAACTGGCCTTGATGCCAACACAGCTAATCTGTAATGATGTTATTGAGAAGATTAGCATTAAGGAAGGACAGTCA
TCTTCTCCATCCATCAGCC

>ABCG2 Nested3 F

CCAACAACCTGGCCTTGATGCCAACACAGCTAATCTGTAATGATGTTATTGAGAAGATTAGCATTAAGGAAGGACAGTCATCTCT
CCATCCATCAGCCAAAGATATTCTTCAAGTTATTTGACAGTTTAAATGCTGTTATCCATGGGTGAATGTGTTTATCATGGACCTGC
CAGTGAATCTTTAGAGTACTTCAAATCTATAGGATACGTTATAGAAGAACACAACAACCCACCAGATTTTCTTAGATGTTATTAAT
GGAGAGGCAATCACTCAGAAAAGACATTGAAGAAGTACATACAAAATTTGGTATCATCATTTCAGAAGTCAACTTTAAATTCAGAT
TACAAAGTCAGATGAATCCTATCTTACAACAGTATCAGCATGCTGTAGAGACCAATACTGTTAAGGTTTTACCTAAAAATAGAATATGC
AACATCAGCTTTTACACAGTTTTAGAGCTGTATCTGGCAGAACATACTTAATTTGCTGAGAAATCCACAGCTGTCAGTTATGCAAGTGG
TTGGTGTGTATAATTTGGACTGATAGTTGGTGTCTTTACTGGCAGCTAGAGAAAGATTGTGTAACAGGAATCCAAAACAGAGTTG
GAGCCTTTTCTTCATTATAATGAATCAAGTATTTGGAAATTTATCGGCAGTAGAATTTGTTTATCAAAGAGAGATCCATATTCATGCA
TGAGAATGTGAGTGGATTTTACAGAGTGTCTGCCTACTTTTCTCCAAGATTATCTGTGATGTAATACCTATGAGACTGATTCAGTT
ATTCTGTTTTCAACTGTACATATTTTATGTTGGGCTTACGACTAGCAGCAGAGAATTTTCTCTGTATGTCCTGTCTATGTTTTTAG
TAGCCATGTCTGCATCAGGAATCGCTTTCTTCTCAGTGTCTACTGTGCCAATATTTGCTGTGGCTAACTTGTGTATTGCTCTCACATA
TGCTTTTATGATGGTATTCAGTGGTTTACTAGTAAATGTATCCTCTGTTCATCATGGTTACGATAGCTGAAATGGGCAAGCTTATTT
AGATATGGTTTTAAACGCATTGGATATAAATGAGTTGAAAGACATGACCTTTTCCAATGGCACAGCAACATGCTCAGGGACTGGTAATG
ATTACCTAATTTGATCAGAACATTCCTTATCAAACAAGCTGGGATTTCTGGCAGAAATATTGTTGCACTAGGGGCCATGTCAGTGATCTC
CATGACCGGTACATACATCCAGCTGAGAAAGATGAAGAAATTAAGATAAAGATCTTATAGTAGAGAAAACATGACAGATTAGTGAAG
GACCAATCCATATGTGTTTCTTGTGGAAAAAGAGTTGTGACCTTTTATAAGTGTGGGGTTTAGCTATCAAGGAACCTACGCTTAT
TTTGAGATTTTTTTTTATTTTTGGCTAGTTAGCTG

>ABCG2 Nested5 R

ATGTTTAAAGAGTTCAGATGTCTTAACCATTTTTACCTAGACAAACACGCGTCAGAAAACGTATCAGTTTGTCAAACCTGTAGAT
TAAGGAATGTCTAAACGAATGGTGTTCAAACCCGGCGTACAACTACGGGTCCAAAGATGAACACTCCAAAGTTGACATGGAATCAA
GTCATTATGAAAGAGCTGCAACGATCACTGGTCATAATATCGTATACAGTGGATGTGAAAACAAAACCATGTTGTGGGCAAAATAGA
GAAGAAGGAAATATTAAGGAATCAATGGTATTTTCAAGCCTGGTATGAATGCCATCCTTGACCAACAGGTAGTGGAAAAATCTTCT
GTATTAGATATATTAGCGGGAAGAAAAGACCCTGCTGGTTTAAAGTGGACATCTCTTACTGGATGGATCTCCACCTCCTGAAAATTTTA
AGTGATGGTGGGATATGTTGTACAGGATGATGTTGTTATGGGTGGACTGAC

Figura A3. Secuencias de los fragmentos del gen *abcg2* de *Mytilus galloprovincialis*. Los cebadores aparecen subrayados.

Tabla A1. Concentración de RNA (ng/ μ L) obtenida por espectrofotometría en muestras de *Mytilus galloprovincialis* en los tejidos de glándula digestiva, branquia y manto. CR: Muestras control procedentes de la ría de Arousa recogidas en septiembre de 2009. GR: Muestras recogidas en la ría de Arousa (Grove A) en julio 2010. BU: Muestras recogidas en la ría de Pontevedra (Bueu) a los dos (1-BU), diez (2-BU), dieciséis (3-BU), y setenta y dos días (4-BU) del cierre de explotación de los polígonos por la presencia de toxina DSP en 2010. Profundidad (en metros): 1, 5 y 10.

MUESTRA	Glándula digestiva			Branquia			Manto		
	RNA Conc	A260/280	A260/230	RNA Conc	A260/280	A260/230	RNA Conc	A260/280	A260/230
CR1	792,03	2,03	2,22	384,89	2,03	2,15	145,03	1,98	1,91
CR2	874,15	1,94	1,96	249,84	2,04	2,08	330,59	2,06	2,10
CR3	180,67	1,97	1,84	204,52	1,97	1,91	136,42	1,92	1,82
CR4	964,09	1,98	2,13	682,49	2,05	2,24	191,14	1,82	2,15
CR5	626,51	1,97	1,97	359,05	2,03	2,13	349,82	1,99	1,95
CR6	293,19	2,03	2,1	279,72	2,04	2,13	307,39	2	2,04
CR7	404,45	2	2,04	221,5	2,04	2,09	804,02	2,06	2,17
CR8	1532,54	2,03	2,23	455,72	2,01	2,11	265,33	2,02	1,97
CR9	2703,57	1,61	1,80	255,64	2,05	2,15	429,7	1,92	2,22
CR10	581,1	1,91	2,15	708,44	2,07	2,25	341,22	1,95	2,15
CR11	319,84	2,04	2,11	419,44	2,03	2,19	407,52	2,01	2,04
CR13	307	2,03	2,15	111,69	2,03	1,97	317,54	2,02	2,08
CR14	878	2,01	2,11	101,83	2,02	1,98	299,60	2	2,01
CR15	450,88	1,9	1,53	69,84	1,86	1,29	84,87	1,96	1,76
CR16	444,63	2,02	2,02	189,42	2,03	2,05	21,36	1,74	0,93
CR17	413,52	2,02	2,23	159,96	1,96	1,80	495,09	2,10	2,22
CR18	428,54	1,97	2,12	240,21	2	2,01	395,18	2,02	2,11
CR19	81,44	1,9	1,8	210,08	2,02	2,01	113,49	1,94	1,74

Tabla A1 (continuación)

MUESTRA	Glándula digestiva				Branquia				Manto			
	RNA Conc	A260/280	A260/230		RNA Conc	A260/280	A260/230		RNA Conc	A260/280	A260/230	
GR1_1m	419,84	2,01	2,19		303,91	2,02	2,10		396,60	2,02	2,14	
GR2_1m	258,27	2,02	2,14		149,55	1,99	2		508,29	2,04	2,10	
GR3_1m	104	2,07	2,05		172,29	2,03	2,01		296,74	2,01	2,09	
GR4_1m	212,59	1,95	1,98		330,62	2,03	2,15		331,43	2,03	2,12	
GR5_1m	315	2,01	2,06		418,71	2,03	2,20		362,02	2,02	2,13	
GR1_5m	515,17	2,03	2,16		236,75	2,03	2,11		403,79	1,99	2,12	
GR2_5m	346,55	2,04	2,1		167,97	2	2,07		229,28	1,92	1,99	
GR3_5m	62,26	1,93	1,51		231,33	2	2,11		150,27	1,92	2,11	
GR4_5m	1184,19	1,97	2,27		413,54	2,02	2,15		63	1,96	1,67	
GR5_5m	976,78	1,92	2,19		344,18	2,03	2,16		104,01	1,76	1,75	
GR1_10m	408,75	2,09	2,03		214,93	2,02	2,04		169,16	1,74	1,93	
GR2_10m	239,19	2,05	2,11		87,32	1,97	1,83		634,62	2,08	2,10	
GR3_10m	362,86	2	2		297,81	2,04	2,16		951,21	2,08	2,17	
GR4_10m	152	1,88	1,98		219	2,02	2,08		116,47	1,95	1,88	
GR5_10m	989,87	1,97	2,21		263,94	2,01	2,08		1280,58	2,05	2,15	
1-BU1_1m	661,13	2,04	2,2		577,53	2,04	2,20		188,14	2	1,93	
1-BU2_1m	1277,68	2,02	2,02		609,85	2,03	2,11		729,7	2,04	2,18	
1-BU3_1m	899,56	2,05	2,13		355,65	2,03	1,72		893,59	2,03	2,1	
1-BU4_1m	1001,26	2,05	2,2		462,41	2,03	2,18		784,2	2,05	2,21	
1-BU5_1m	785,33	2,06	2,21		324,03	2,03	2,11		1149,81	2,06	2,25	
1-BU1_5m	930,61	2,07	2,27		457,27	2,02	2,18		144,96	1,95	2,06	
1-BU2_5m	651,83	2,06	2,2		454,15	2,03	2,16		321,9	1,98	2,15	
1-BU3_5m	786,52	2,06	2,24		524,75	2,05	2,18		314,44	2,02	2,12	
1-BU4_5m	1053,56	2,04	2,06		575,20	2,07	2,22		579,5	2,07	2,17	
1-BU5_5m	909,56	2,06	2,14		338,54	2,05	2,17		1368,86	2,03	2	
1-BU1_10m	834,38	2,01	2,29		378,60	2,04	2,16		321,42	1,89	2,36	
1-BU2_10m	610,29	2	1,95		280,07	2,05	2,14		381,82	2,02	2,13	
1-BU3_10m	1325,55	2,01	2,08		336,64	2,04	2,20		299,36	1,85	2,33	
1-BU4_10m	1860,14	1,99	2,25		411,17	2,04	2,21		141,46	2	1,94	
1-BU5_10m	653,84	2,03	2,2		406,04	2,02	2,19		442,73	1,92	2,23	

Tabla A1 (continuación)

MUESTRA	Glándula digestiva			Branquia			Manto		
	RNA Conc	A260/280	A260/230	RNA Conc	A260/280	A260/230	RNA Conc	A260/280	A260/230
2-BU1_1m	1562,6	2	2,25	193,72	2,03	2,03	567,9	2,07	2,18
2-BU2_1m	1000,44	2	2,17	164,14	2,01	1,93	295,17	1,9	2,26
2-BU3_1m	2147,56	2,02	2,23	576,09	2,08	2,28	508,28	2,08	2,18
2-BU4_1m	3155,13	1,64	1,76	291,51	2,03	2,12	940,65	2,06	2,22
2-BU5_1m	1524,37	2,04	2,21	248,18	2,02	2,11	276,9	2,03	2,15
2-BU1_5m	2015,91	2,06	2,25	277,85	2,04	2,12	361,04	2,01	2,13
2-BU2_5m	912,86	2,05	2,28	737,78	2,06	2,26	525,61	2,1	2,18
2-BU3_5m	4169,71	1,11	1,24	311,92	2,04	2,16	253,45	2,01	2,02
2-BU4_5m	2781,93	2	2,17	451,13	2,01	2,03	393,75	1,98	2,17
2-BU5_5m	2076	1,97	1,94	430,54	2,02	2,10	448,15	1,94	2,27
2-BU1_10m	4241,9	1,08	1,16	342,30	2,02	2,13	273,79	2,05	2,13
2-BU2_10m	1469,58	2,06	2,31	330,55	1,98	2,04	303,77	1,89	2,3
2-BU3_10m	1707	2,03	2,28	685,20	2,08	2,24	168,64	1,96	2,1
2-BU4_10m	1948,62	2,02	2,2	576,47	2,07	2,25	1035,61	2,06	2,19
2-BU5_10m	1178,36	2	2,23	613,44	2,09	2,27	183,67	1,88	2,24
3-BU1_1m	496,86	1,99	2,09	514,95	2,07	2,20	127,1	1,99	1,85
3-BU2_1m	173,12	1,91	1,32	308,79	2,04	2,05	324,34	2,02	2,12
3-BU3_1m	478	1,97	1,81	582,56	2,05	2,22	214,57	1,85	2,3
3-BU4_1m	1015,73	2,01	2,21	383,84	2,04	2,15	242,32	1,84	2,16
3-BU5_1m	2159,83	2	2,05	319,73	2,05	2,10	245,03	2,03	2,21
3-BU1_5m	1461,01	2,04	2,25	399,33	2,04	2,06	405,48	2,01	2,15
3-BU2_5m	2077,58	2,02	2,16	265,71	2,06	2,06	215,58	1,65	1,76
3-BU3_5m	551,27	2,03	2,14	307,26	2,03	2,07	421,73	2,05	2,18
3-BU4_5m	2783,76	2	1,93	348,88	2,04	2,11	411,09	2,01	2,16
3-BU5_5m	2201,45	1,99	2,03	380,46	2,03	2,17	242,02	1,81	2,26
3-BU1_10m	1809,67	1,99	2,13	344,86	2,04	2	218,45	1,98	2,06
3-BU2_10m	1229,77	2,1	2,28	371,95	2,04	2,14	158,26	1,92	2,05
3-BU3_10m	1970,41	1,97	2,05	198,39	2,03	2,04	324,44	2,01	2,17
3-BU4_10m	1008,22	2,02	2,02	309,22	2,05	1,98	242,66	2	2,06
3-BU5_10m	2533,66	1,97	2,19	181,33	2,06	1,98	340,21	1,9	2,21

Tabla A1 (continuación)

MUESTRA	Glándula digestiva			Branquia			Manto		
	RNA Conc	A260/280	A260/230	RNA Conc	A260/280	A260/230	RNA Conc	A260/280	A260/230
4-BU1_1m	783,63	1,92	2,07	957,53	2,06	2,25	322,74	1,93	2
4-BU2_1m	394,24	1,85	1,2	514,56	2,07	2,19	216,09	2,03	2,02
4-BU3_1m	368,2	1,94	2,07	333,53	2,02	2,14	157,48	1,89	2,02
4-BU4_1m	347,77	1,98	1,51	227,14	2,01	2,11	312,1	2,07	2,07
4-BU5_1m	994,67	1,95	2,03	273,26	2,03	2,10	167,52	2,01	2,06
4-BU1_5m	910,29	1,91	1,97	367,88	2,03	2,21	247,16	1,98	1,96
4-BU2_5m	2279,42	1,61	1,73	604,02	2,02	2,24	808,06	2,02	2,11
4-BU3_5m	1999,82	1,53	1,67	362	2,04	2,17	304,4	1,99	2,08
4-BU4_5m	305,09	1,76	1,21	226,95	2	1,95	228,01	2,01	2,04
4-BU5_5m	1270,59	1,67	1,82	371,88	2,03	2,13	280,47	2,01	2,13
4-BU1_10m	1056,99	1,71	2,01	399,45	2,03	2,16	192,64	1,77	1,77
4-BU2_10m	1797,13	1,87	1,91	790,45	2,02	2,22	533,92	2,02	1,96
4-BU3_10m	613,54	1,76	1,7	387,26	2,03	2,07	175,55	2	1,98
4-BU4_10m	555,26	1,82	2,13	340,29	2,04	2,16	189,32	1,78	1,68
4-BU5_10m	294,12	2,02	2,12	254,37	2,04	2,14	208,06	1,9	1,34

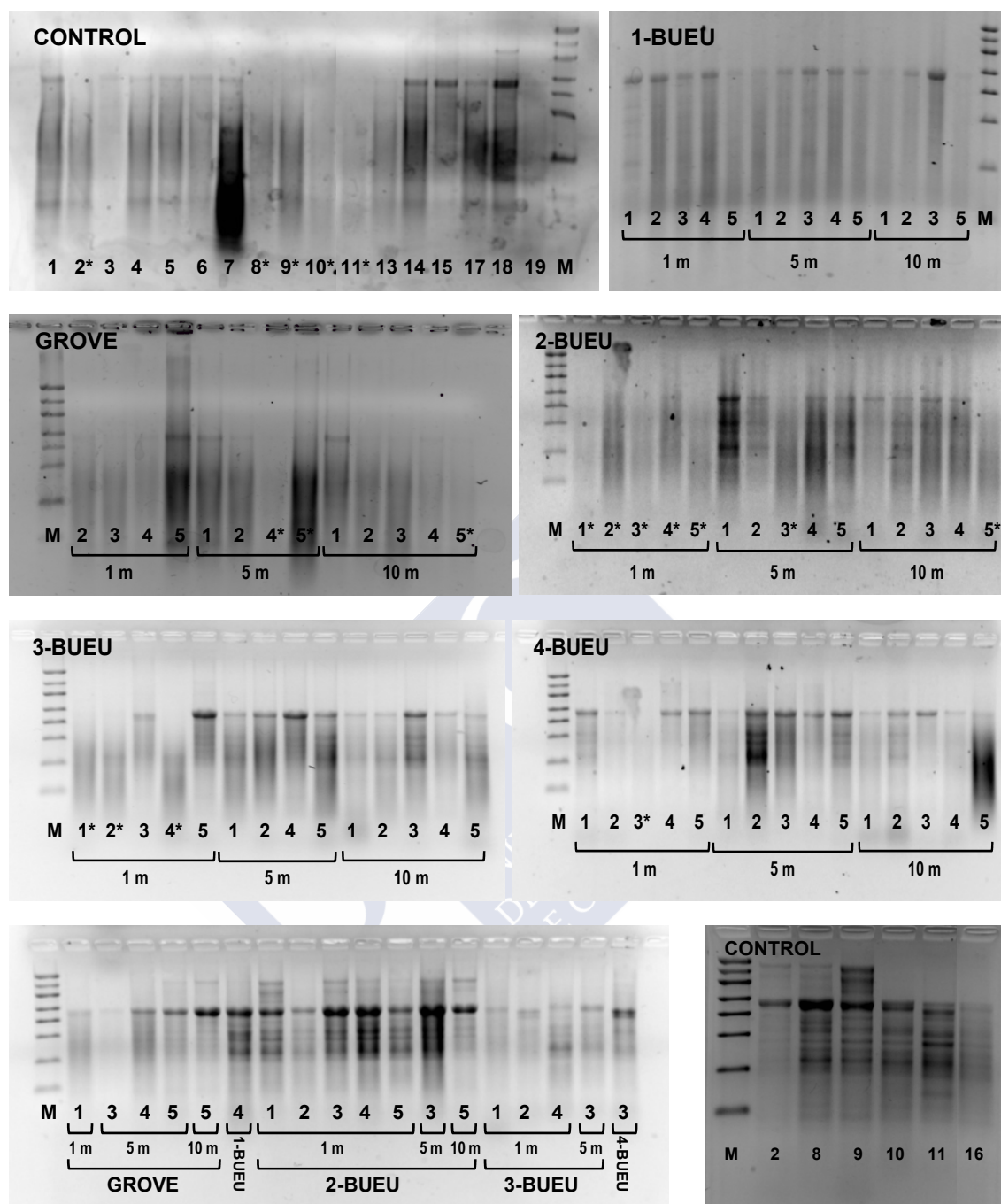


Figura A4. Extracción de RNA total en muestras de *Mytilus galloprovincialis* para el tejido de glándula digestiva. El RNA obtenido en las extracciones se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa D1 al 1%. M: marcador de RNA *RiboRuler™ High Range RNA Ladder* (Fermentas). (*) Muestras que presentan un RNA degradado o con baja concentración.

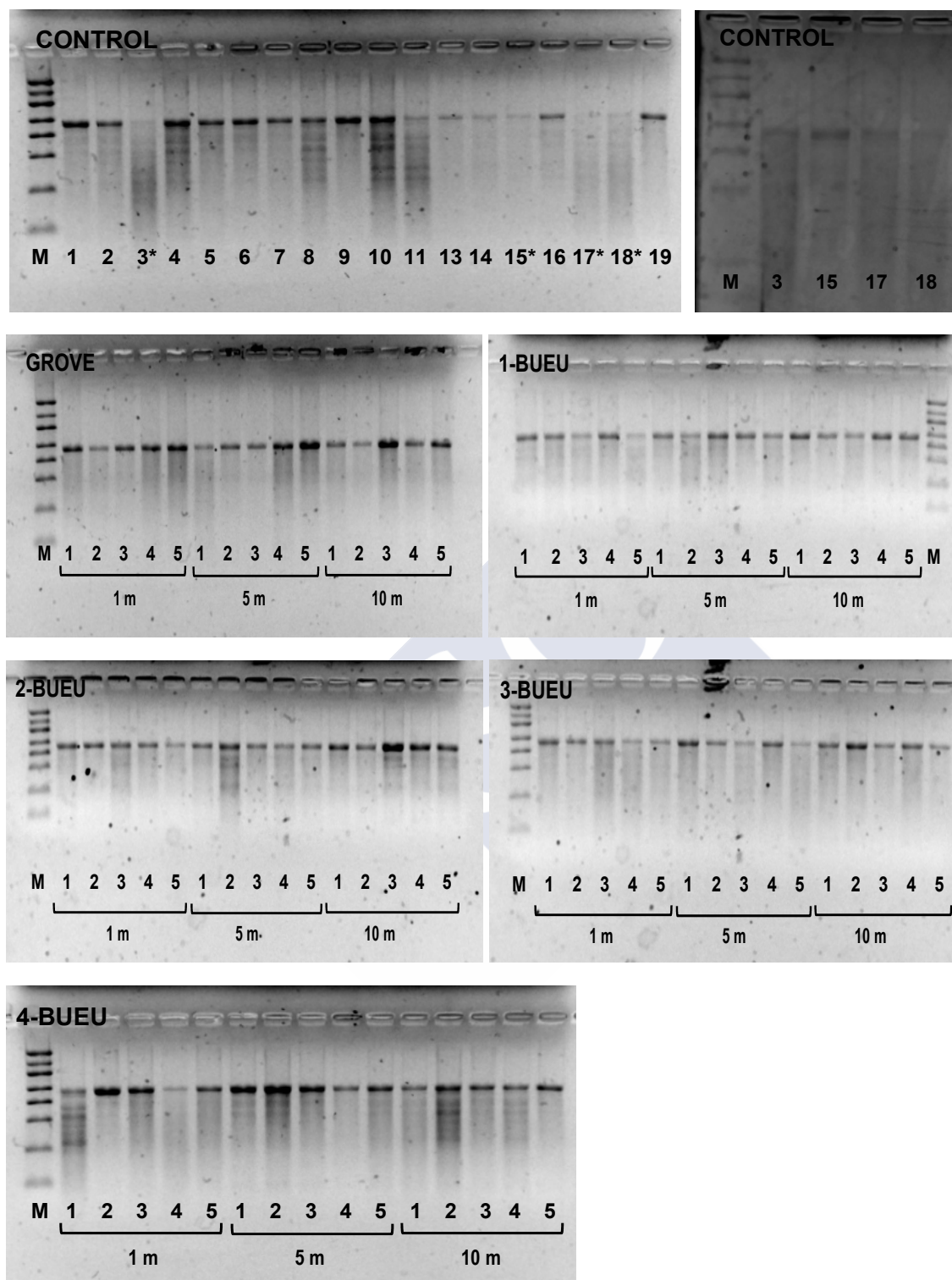


Figura A5. Extracción de RNA total en muestras de *Mytilus galloprovincialis* para el tejido de branquia. El RNA obtenido en las extracciones se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa D1 al 1%. M: marcador de RNA *RiboRuler™ High Range RNA Ladder* (Fermentas). (*) Muestras que presentan un RNA degradado o con baja concentración.

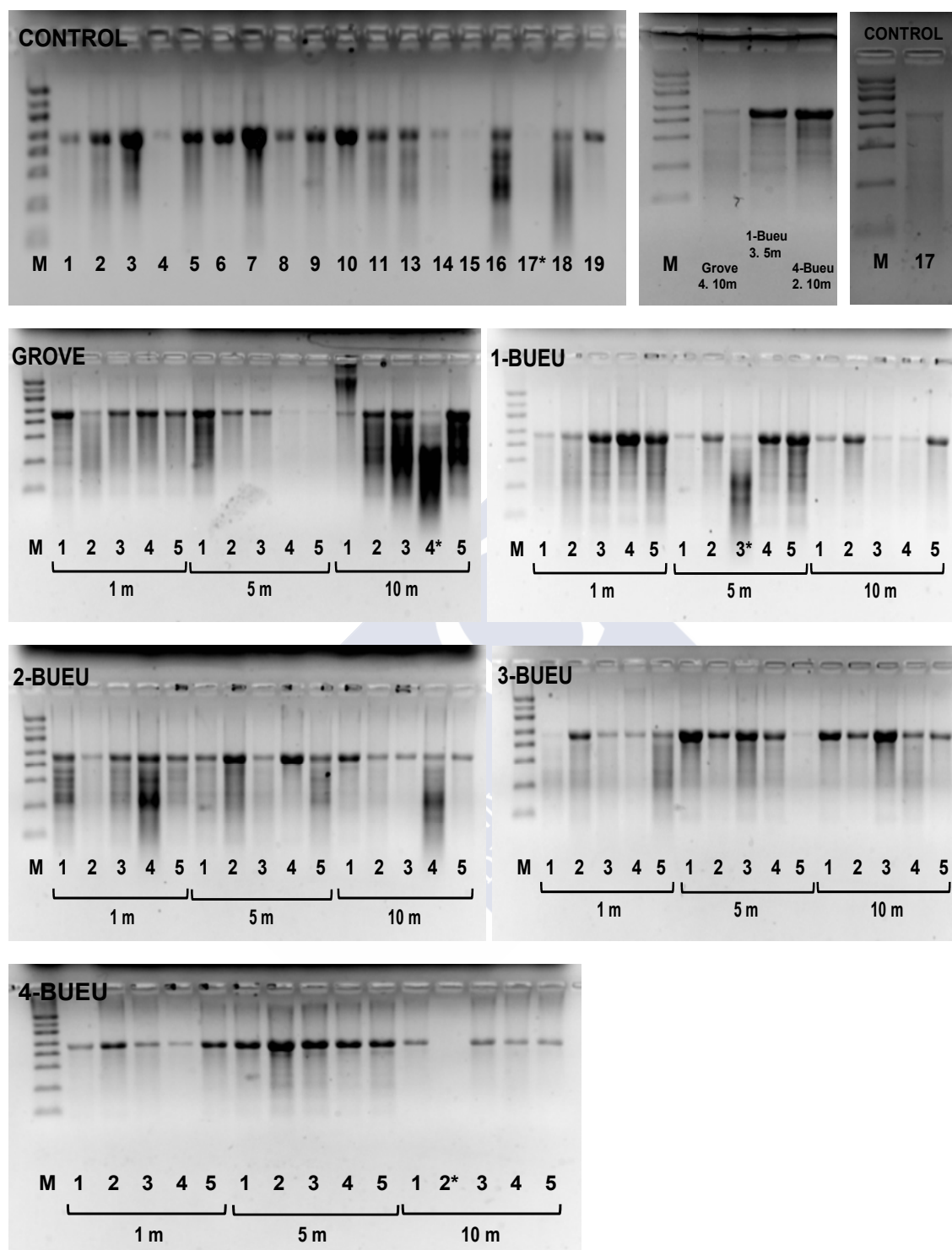


Figura A6. Extracción de RNA total en muestras de *Mytilus galloprovincialis* para el tejido de manto. El RNA obtenido en las extracciones se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa D1 al 1%. M: marcador de RNA *RiboRuler™ High Range RNA Ladder* (Fermentas). (*) Muestras que presentan un RNA degradado o con baja concentración.

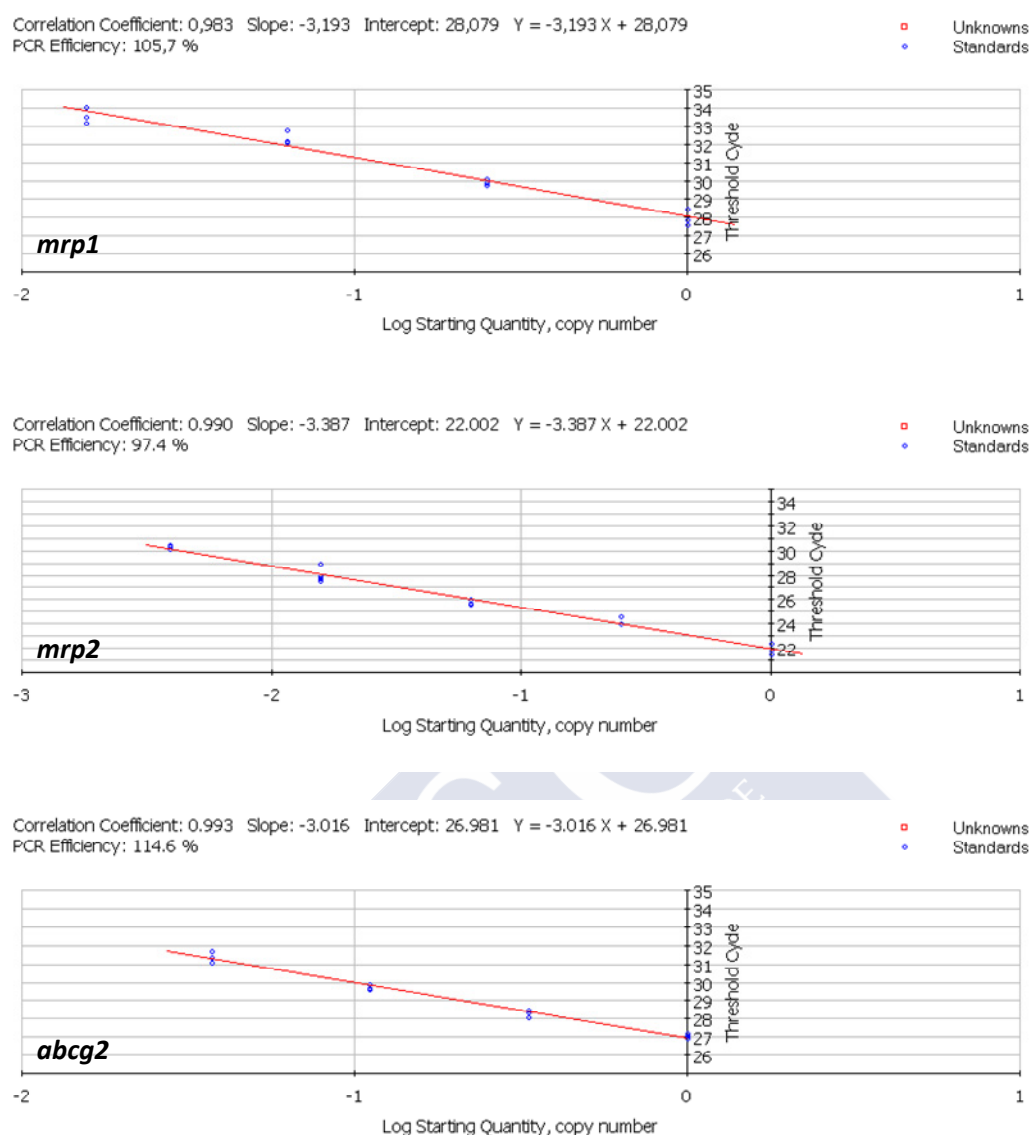


Figura A7. Curvas estándar de la RT-qPCR para los distintos genes en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*. Las curvas han sido generadas con el Bio-Rad iCycler iQ™ software. Se representan los valores del C_q (ciclo de cuantificación o ciclo umbral; *threshold cycle*) de cada conjunto de diluciones seriadas frente al logaritmo del factor de dilución del cDNA. La eficiencia de la reacción (E%) viene dada por $[10^{(1/-S)} - 1] \times 100$, donde S representa la pendiente (*slope*) de la recta de la regresión lineal.

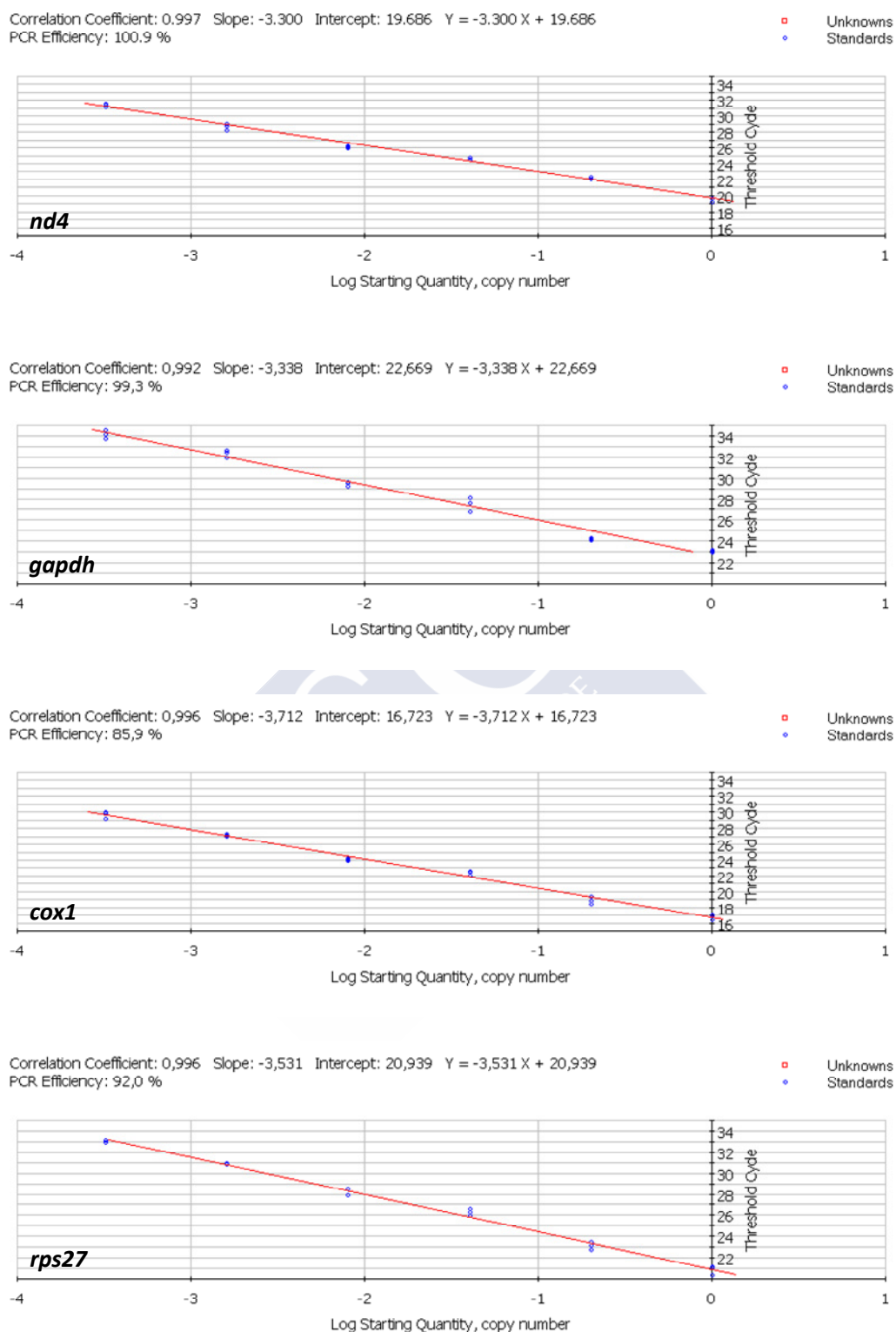


Figura A7 (continuación)

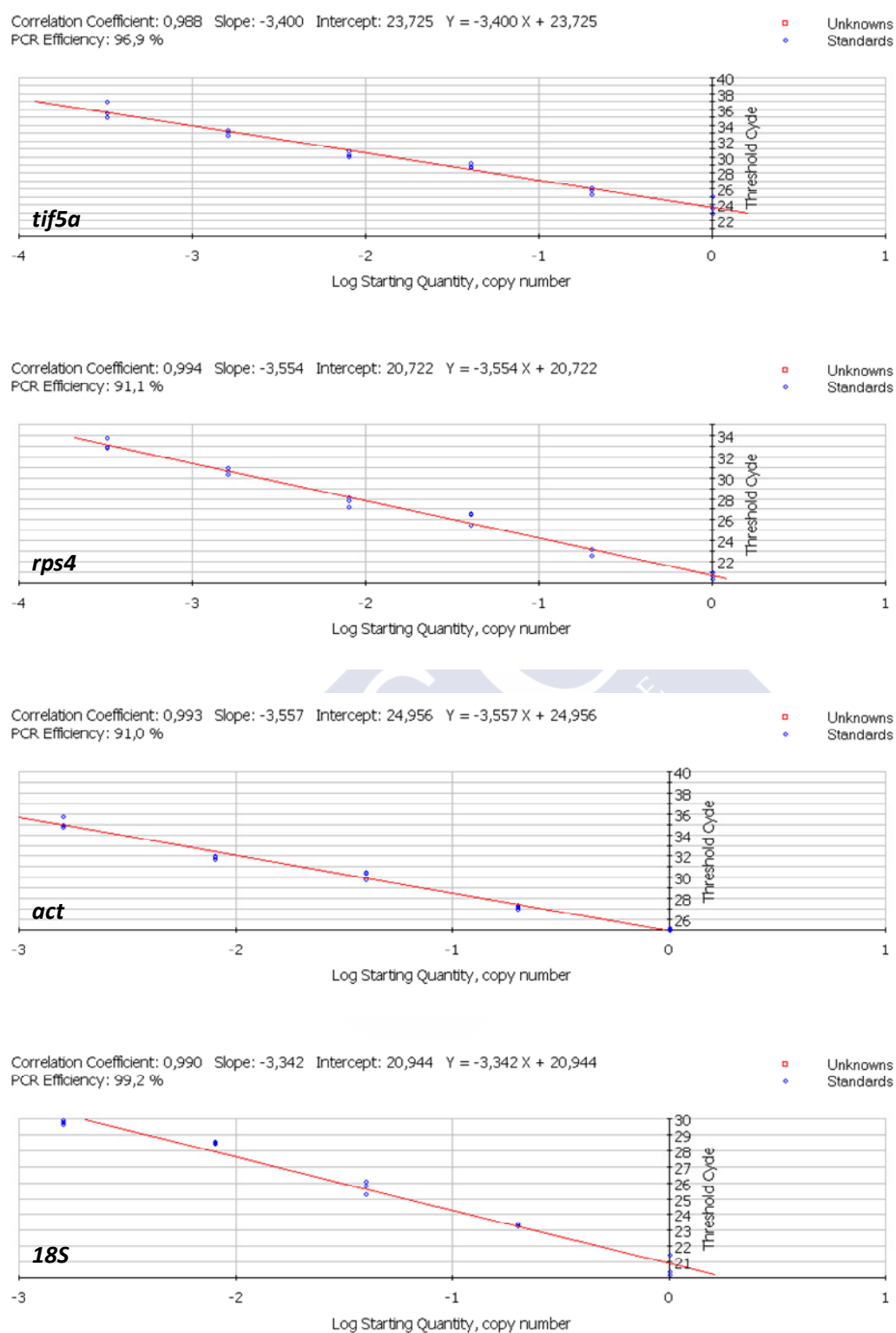


Figura A7 (continuación)

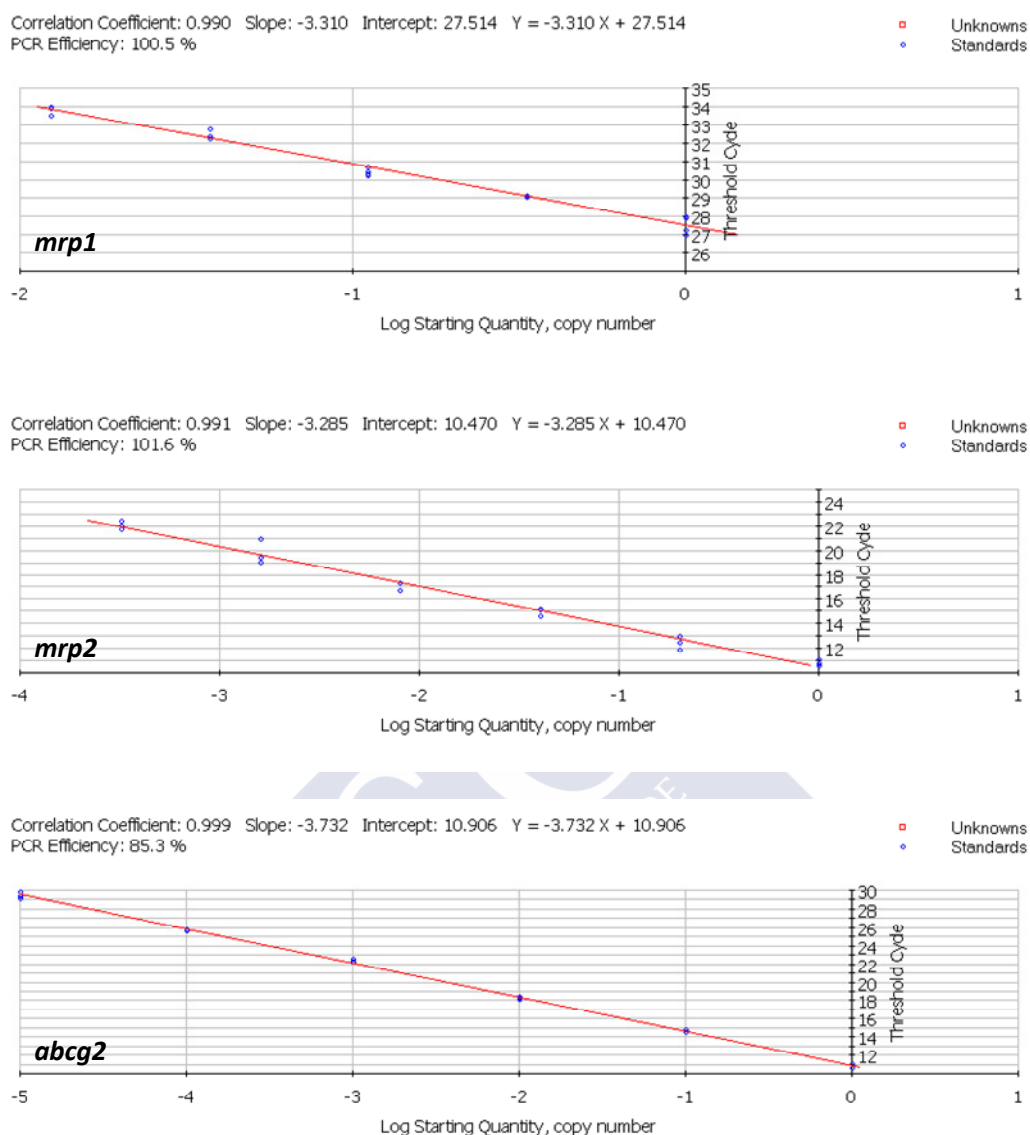


Figura A8. Curvas estándar de la RT-qPCR para los distintos genes en la branquia de *Mytilus galloprovincialis*. Las curvas han sido generadas con el Bio-Rad iCycler iQ™ software. Se representan los valores del C_q (ciclo de cuantificación o ciclo umbral; *threshold cycle*) de cada conjunto de diluciones seriadas frente al logaritmo del factor de dilución del cDNA. La eficiencia de la reacción (E%) viene dada por $[10^{(1/-S)} - 1] \times 100$, donde S representa la pendiente (*slope*) de la recta de la regresión lineal.

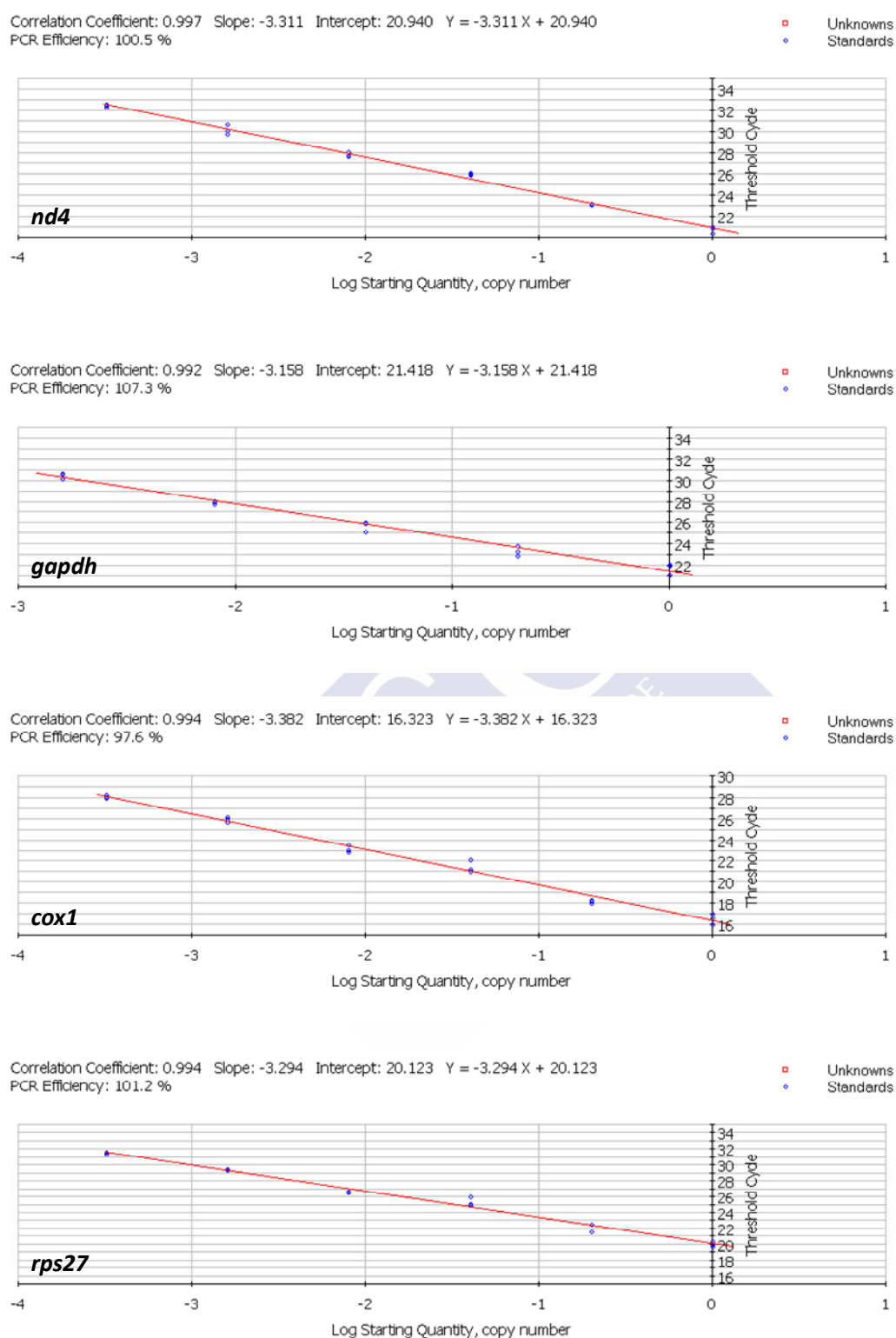


Figura A8 (continuación)

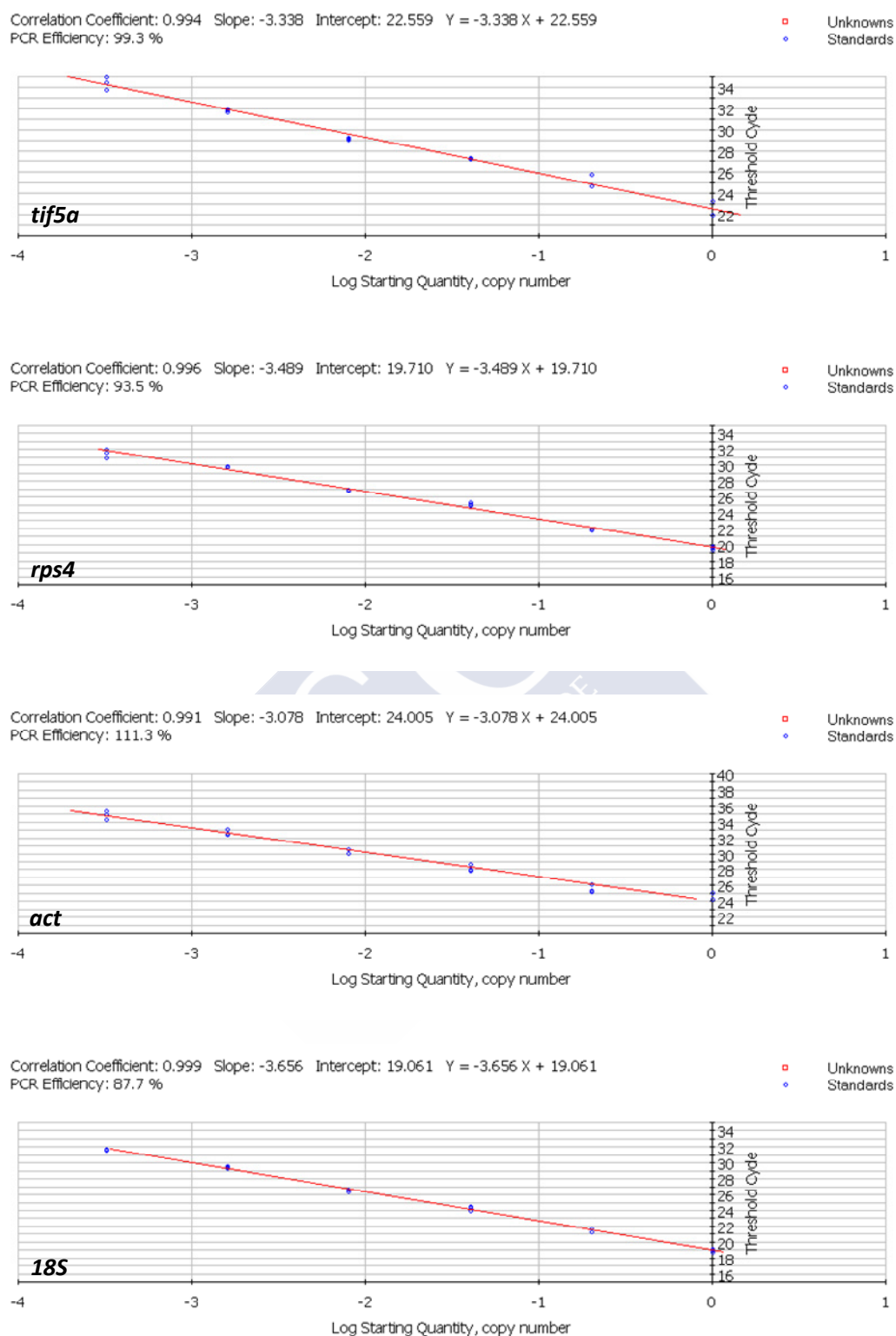


Figura A8 (continuación)

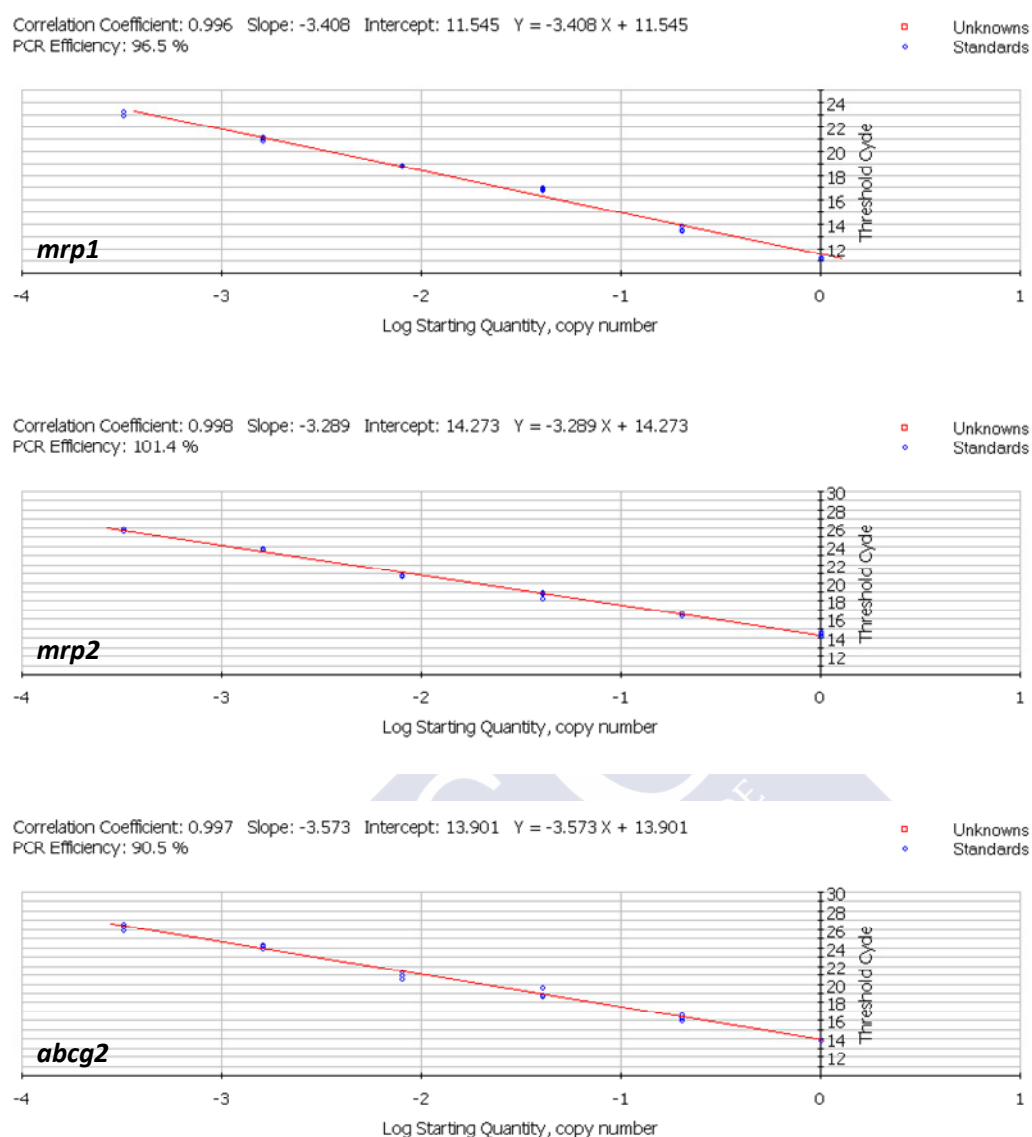


Figura A9. Curvas estándar de la RT-qPCR para los distintos genes en el manto de *Mytilus galloprovincialis*. Las curvas han sido generadas con el Bio-Rad iCycler iQ™ software. Se representan los valores del C_q (ciclo de cuantificación o ciclo umbral; *threshold cycle*) de cada conjunto de diluciones seriadas frente al logaritmo del factor de dilución del cDNA. La eficiencia de la reacción (E%) viene dada por $[10^{(1/S)} - 1] \times 100$, donde S representa la pendiente (*slope*) de la recta de la regresión lineal.

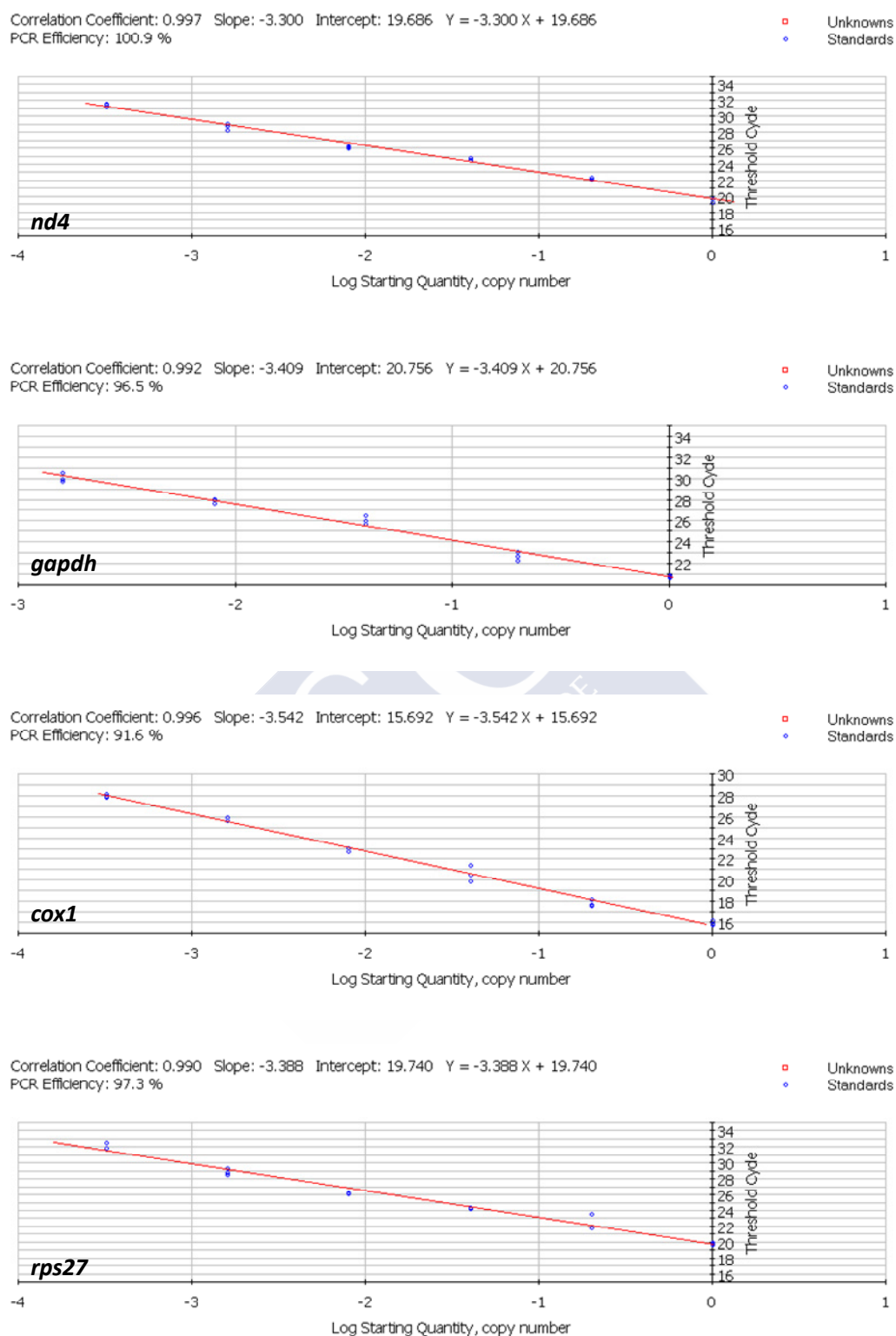
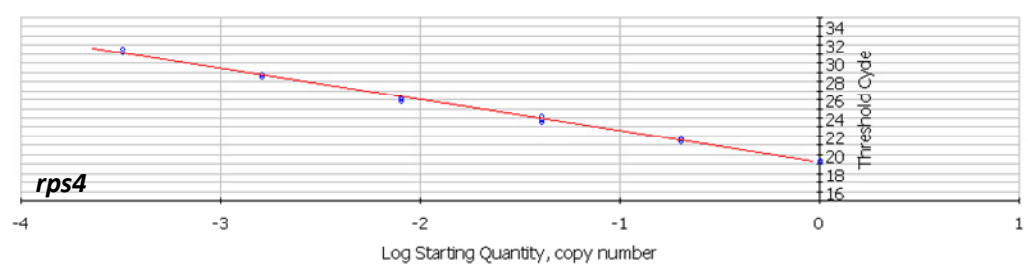


Figura A9 (continuación)

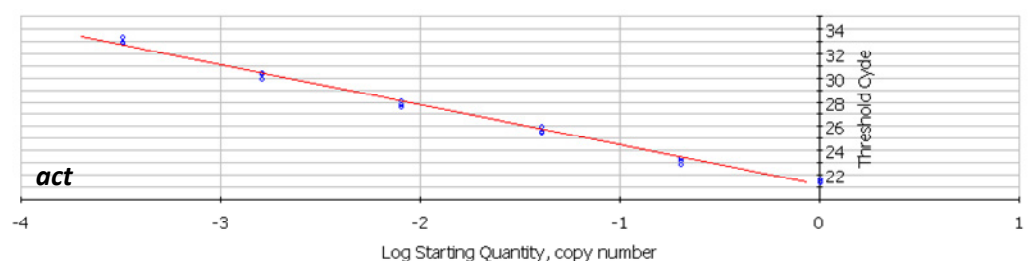
Correlation Coefficient: 0.991 Slope: -3.217 Intercept: 21.790 $Y = -3.217 X + 21.790$
PCR Efficiency: 104.6 %



Correlation Coefficient: 0.998 Slope: -3.426 Intercept: 19.207 $Y = -3.426 X + 19.207$
PCR Efficiency: 95.8 %



Correlation Coefficient: 0.996 Slope: -3.314 Intercept: 21.169 $Y = -3.314 X + 21.169$
PCR Efficiency: 100.3 %



Correlation Coefficient: 0.996 Slope: -3.475 Intercept: 18.514 $Y = -3.475 X + 18.514$
PCR Efficiency: 94.0 %

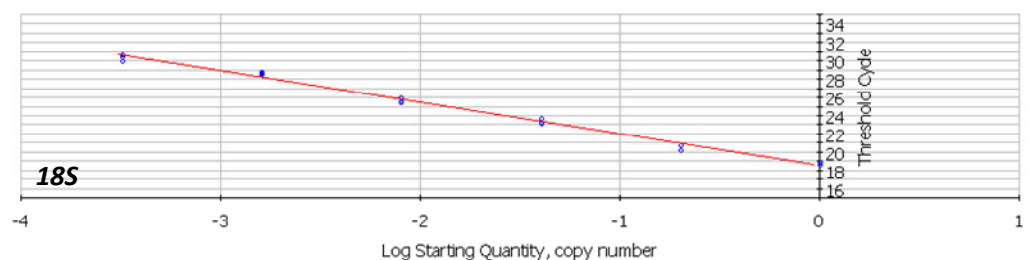


Figura A9 (continuación)

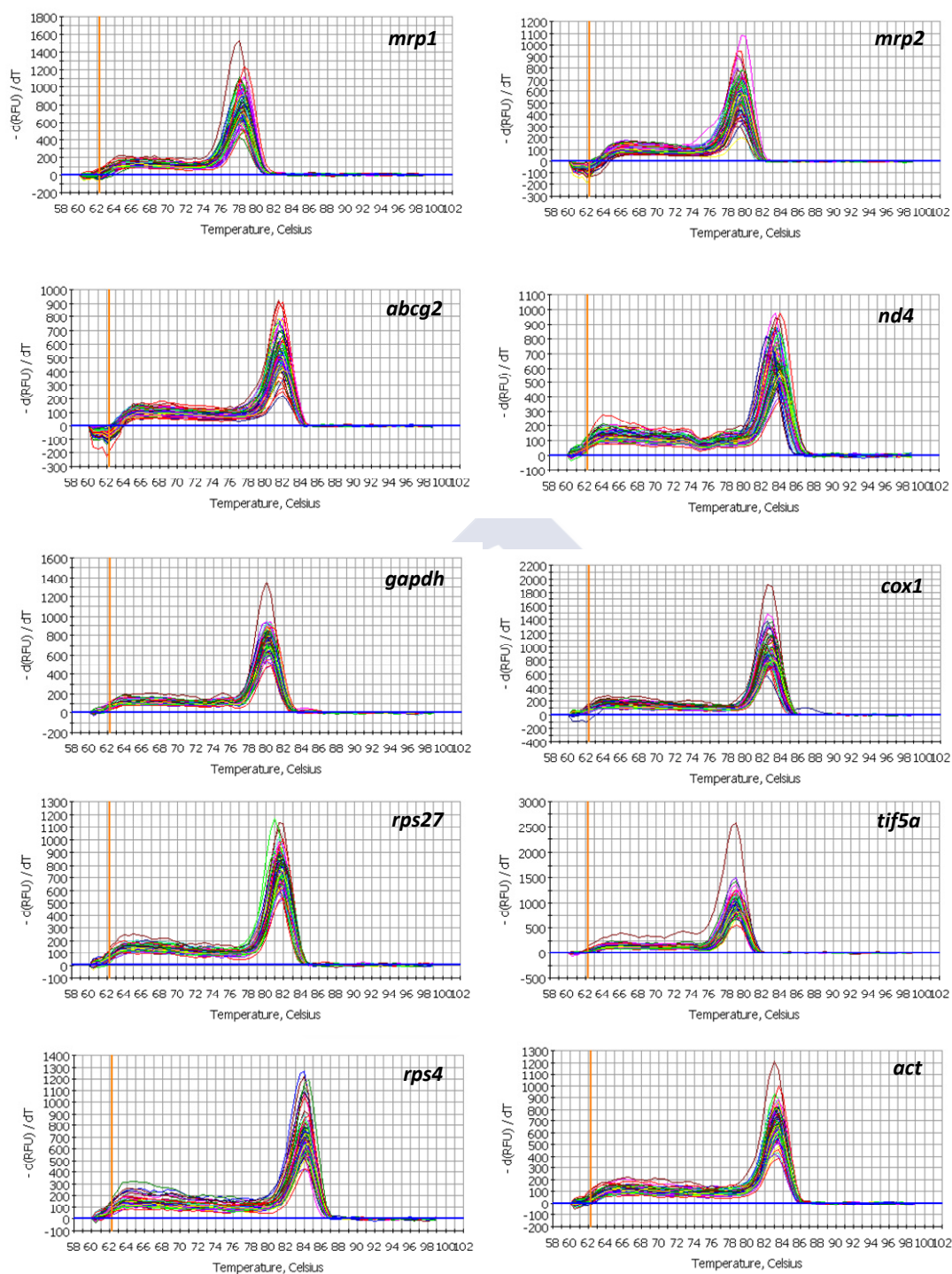


Figura A10. Análisis de las curvas de fusión de los distintos genes en la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis*. Las curvas han sido generadas con el Bio-Rad iCycler iQ™ software.

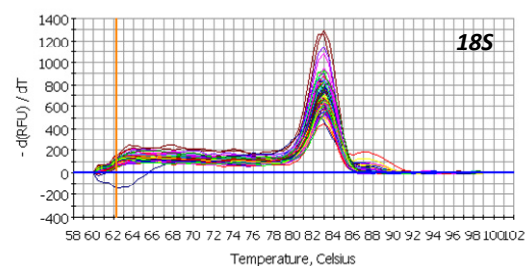


Figura A10 (continuación)

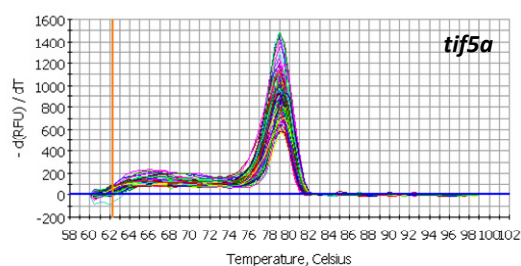
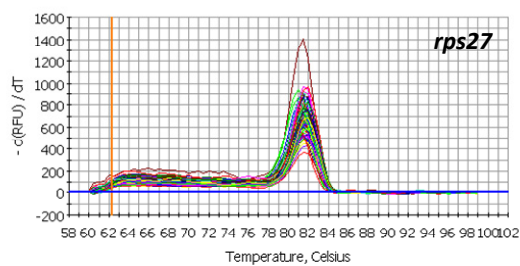
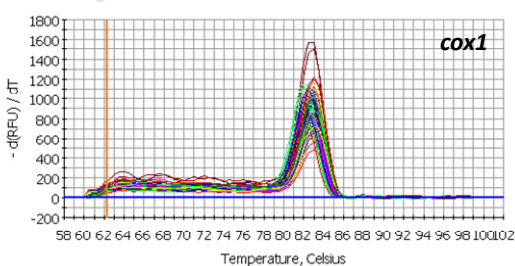
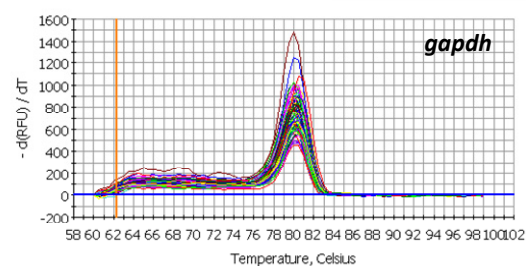
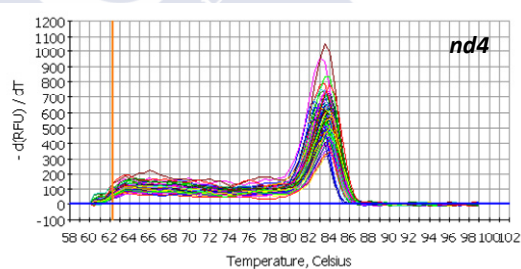
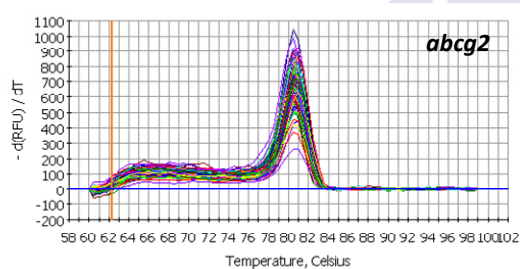
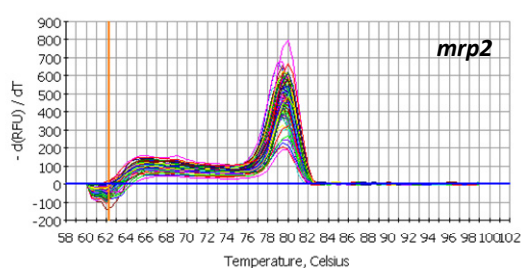
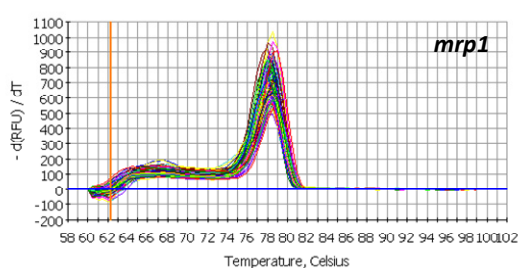


Figura A11. Análisis de las curvas de fusión de los distintos genes en la branquia de *Mytilus galloprovincialis*. Las curvas han sido generadas con el Bio-Rad iCycler iQ™ software.

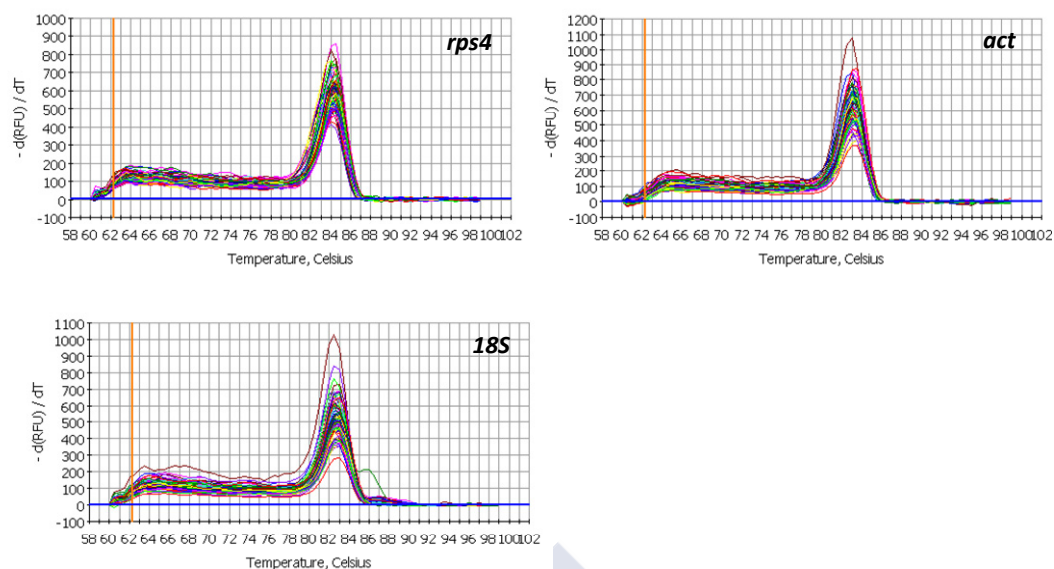


Figura A11 (continuación)

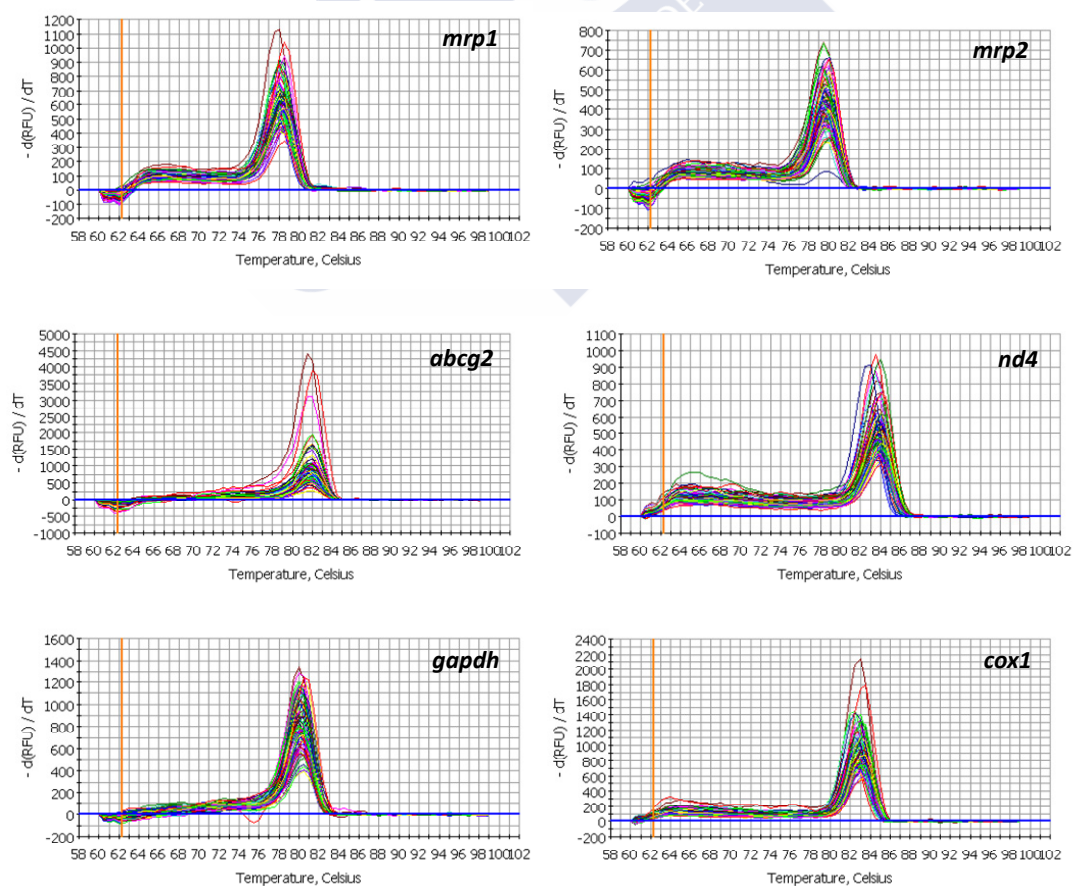


Figura A12. Análisis de las curvas de fusión de los distintos genes en el manto de *Mytilus galloprovincialis*. Las curvas han sido generadas con el Bio-Rad iCycler iQ™ software.

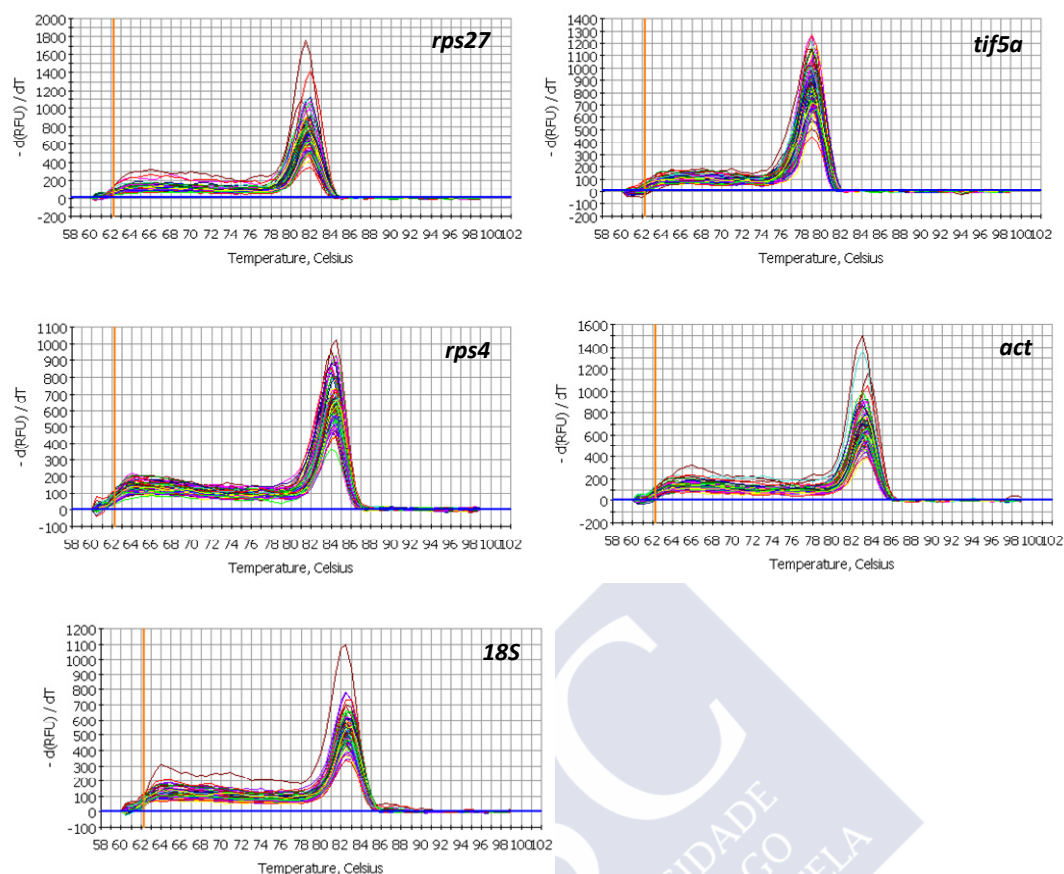


Figura A12 (continuación)